

10/528659  
Rec'd ST/PTO 22 MAR 2005  
PCT/JP 03/12052

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

22.0

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2002年 9月25日

出願番号  
Application Number: 特願2002-280034  
[ST. 10/C]: [JP2002-280034]

FILED 06 NOV 2003

W. O. PCT

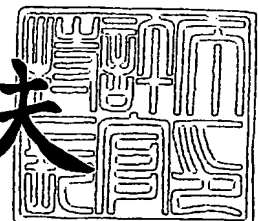
出願人  
Applicant(s): 財団法人名古屋産業科学研究所  
財団法人岐阜県国際バイオ研究所

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月24日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願  
【整理番号】 C02007  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12N 15/09

## 【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市緑区ほら貝 2-82-3 グローリアス  
緑区ほら貝 702号

【氏名】 山田 芳司

## 【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市緑区神の倉 3-98

【氏名】 横田 充弘

## 【特許出願人】

【持分】 003/004

【識別番号】 598091860

【氏名又は名称】 財団法人名古屋産業科学研究所

## 【特許出願人】

【持分】 001/004

【識別番号】 500572649

【氏名又は名称】 財団法人岐阜県国際バイオ研究所

## 【代理人】

【識別番号】 100114362

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 萩野 幹治

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 102751

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0200890

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 高血圧のリスク診断方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の工程(a)を含んでなる、核酸試料の遺伝子型を検出する方法、

(a) 核酸試料における、以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程、

- (1) グリコプロテインIa遺伝子の塩基番号1648位の多型、
- (2) ケモカイン受容体2遺伝子の塩基番号190位の多型、
- (3) アポリポプロテインC-III遺伝子の塩基番号1100位の多型、及び
- (4) G-タンパク質  $\beta$ 3サブユニット遺伝子の塩基番号825位の多型。

【請求項 2】 以下の工程(b)を含んでなる、核酸試料の遺伝子型を検出する方法、

(b) 核酸試料における、以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程、

- (5) 腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の塩基番号-850位の多型、
- (6) 腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の塩基番号-238位の多型、
- (7) インスリン受容体サブストレート1遺伝子の塩基番号3494位の多型、及び
- (8) グリコプロテインIb  $\alpha$  遺伝子の塩基番号1018位の多型。

【請求項 3】 以下の工程(i)～(iii)を含んでなる、高血圧のリスク診断方法、

(i) 核酸試料における、以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程、

- (1) グリコプロテインIa遺伝子の塩基番号1648位の多型、
- (2) ケモカイン受容体2遺伝子の塩基番号190位の多型、
- (3) アポリポプロテインC-III遺伝子の塩基番号1100位の多型、及び
- (4) G-タンパク質  $\beta$ 3サブユニット遺伝子の塩基番号825位の多型、

(ii) 前記工程によって得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定する工程、及び

(iii) 決定された遺伝子型から高血圧の遺伝的リスクを求める工程。

【請求項 4】 以下の工程(iv)～(vi)を含んでなる、高血圧のリスク診断方法、

(iv) 核酸試料における、以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程、

(5) 腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の塩基番号-850位の多型、

(6) 腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の塩基番号-238位の多型、

(7) インスリン受容体サブストレート1遺伝子の塩基番号3494位の多型、及び

(8) グリコプロテインIb  $\alpha$  遺伝子の塩基番号1018位の多型、

(v) 前記工程によって得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定する工程、及び

(vi) 決定された遺伝子型から高血圧の遺伝的リスクを求める工程。

【請求項 5】 以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の核酸を含んでなる遺伝子型検出用キット、

(1) グリコプロテインIa遺伝子の塩基番号1648位の多型を解析するための核酸、

(2) ケモカイン受容体2遺伝子の塩基番号190位の多型を解析するための核酸、

(3) アポリポプロテインC-III遺伝子の塩基番号1100位の多型を解析するための核酸、及び

(4) G-タンパク質  $\beta$ 3サブユニット遺伝子の塩基番号825位の多型を解析するための核酸。

【請求項 6】 以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の核酸を含んでなる遺伝子型検出用キット、

(5) 腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の塩基番号-850位の多型を解析するための核酸、

(6) 腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の塩基番号-238位の多型を解析するための核酸、

(7) インスリン受容体サブストレート1遺伝子の塩基番号3494位の多型を解析するための核酸、及び

(8) グリコプロテインIb  $\alpha$  遺伝子の塩基番号1018位の多型を解析するための核酸。

【請求項 7】 以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の核酸が不溶性支持体に固定されてなる固定化核酸、

(1)グリコプロテインIa遺伝子の塩基番号1648位の多型を解析するための核酸

(2)ケモカイン受容体2遺伝子の塩基番号190位の多型を解析するための核酸、

(3)アポリポプロテインC-III遺伝子の塩基番号1100位の多型を解析するための核酸、及び

(4)G-タンパク質 $\beta$ 3サブユニット遺伝子の塩基番号825位の多型を解析するための核酸。

【請求項 8】 以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の核酸が不溶性支持体に固定されてなる固定化核酸、

(5)腫瘍壊死因子 $\alpha$ 遺伝子の塩基番号-850位の多型を解析するための核酸、

(6)腫瘍壊死因子 $\alpha$ 遺伝子の塩基番号-238位の多型を解析するための核酸、

(7)インスリン受容体サブストレート1遺伝子の塩基番号3494位の多型を解析するための核酸、及び

(8)グリコプロテインIb $\alpha$ 遺伝子の塩基番号1018位の多型を解析するための核酸。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は高血圧に関連する遺伝子を利用した検出方法に関する。詳しくは高血圧に関連する複数の遺伝子の多型を利用した検出方法及び該方法に用いられるキットに関する。高血圧を発症するリスクを求めることに本発明を利用できる。

【0002】

【従来の技術】

高血圧は多因子疾患であり、個人個人の遺伝的背景と多様な環境因子の相互作用により発症が規定される（非特許文献1）。高血圧は冠動脈疾患、脳卒中、慢性腎疾患の主要な危険因子であるため、高血圧の予防は社会的・公衆衛生学的に重要である。高血圧を予防するための一つの方法は高血圧感受性遺伝子を同定す

ることである。連鎖解析（非特許文献2～4）および候補遺伝子による関連解析（非特許文献5～8）により、高血圧と関連する染色体上のいくつかの遺伝子座および候補遺伝子群が同定された。今までにゲノム疫学的研究によりアンギオテンシノーゲン（非特許文献5）、 $\alpha$ -アデューシン（非特許文献6）、Gタンパク質 $\beta$ 3サブユニット（非特許文献7）、および $\beta$ 2アドレナリン受容体（非特許文献8）などの遺伝子多型と高血圧罹患との関連が報告されているが、高血圧感受性遺伝子は未だ十分に同定されていない。さらに、異なる人種では異なるゲノム多型を有するため、それぞれの人種で多型と高血圧との関連についてのデータベースを構築することが重要である。

### 【0003】

#### 【非特許文献1】

Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell*. 2001;104:545-556.

#### 【非特許文献2】

Xu X, Rogus JJ, Terwedow HA, Yang J, Wang Z, Chen C, Niu T, Wang B, Xu H, Weiss S, Schork NJ, Fang Z. An extreme-sib-pair genome scan for genes regulating blood pressure. *Am J Hum Genet*. 1999;64:1694-1701.

#### 【非特許文献3】

Krushkal J, Ferrell R, Mockrin SC, Turner ST, Sing CF, Boerwinkle E. Genome-wide linkage analysis of systolic blood pressure using highly discordant siblings. *Circulation*. 1999;99:1407-1411.

#### 【非特許文献4】

Rice T, Rankinen T, Province MA, Chagnon YC, Perusse L, Borecki IB, Bo u chard C, Rao DC. Genome-wide linkage analysis of systolic and diastolic blood pressure: the Quebec Family Study. *Circulation*. 2000;102:1956-1963.

#### 【非特許文献5】

Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Char ru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel J-M, Corvol P. Molecula

r basis of human hypertension: role of angiotensinogen. Cell. 1992;71:169-180.

【非特許文献 6】

Cusi D, Barlassina C, Azzani T, Casari G, Citterio L, Devoto M, Glorio N, Lanzani C, Manunta P, Righetti M, Rivera R, Stella P, Troffa C, Zagato L, Bianchi G. Polymorphisms of  $\alpha$ -adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension. Lancet. 1997;349:1353-1357.

【非特許文献 7】

Siffert W, Rosskopf D, Siffert G, Busch S, Moritz A, Erbel R, Sharma AM, Ritz E, Wichmann H-E, Jakobs KH, Horsthemke B. Association of a human G-protein  $\beta_3$  subunit variant with hypertension. Nat Genet. 1998;18:45-48.

【非特許文献 8】

Bray MS, Krushkal J, Li L, Ferrell R, Kardina S, Sing CF, Turner ST, Boerwinkle E. Positional genomic analysis identifies the  $\beta_2$ -adrenergic receptor gene as a susceptibility locus for hypertension. Circulation. 2000;101:2877-2882.

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

以上のように、今までに数多くの遺伝子多型と高血圧との関連解析が行われてきた。しかし多くの研究についてはその意義について一定の見解は得られていない。その主な理由は多くの研究においては対象集団の大きさが十分でないことと、遺伝子多型のみならず環境因子が人種間で異なっていることに起因する。さらに、たとえ高血圧との関連が認められたとしても、大規模集団における解析では相対危険度（オッズ比）が低いのが一般的である。

本発明は以上の背景に鑑みなされたものであって、その目的は高精度で予知確率の高い高血圧の遺伝子リスクを診断する手段を提供し、高血圧の一次予防に貢献することである。

【0005】



## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、以上の目的を達成するために数種類の公的データベースを用いて冠動脈硬化、冠動脈攣縮、高血圧、糖尿病、高脂血症などとの関連が推定される71遺伝子を抜粋し、遺伝子の機能変化との関連が予想されるものなどを中心に112多型を選択した。続いて、この71遺伝子112多型に関して心筋梗塞との関連解析を心筋梗塞445例と対照464例について行い、男性で19個、女性で18個の一塩基多型 (SNP: single nucleotide polymorphism) が心筋梗塞発症と関連することを見出したが (Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, et al. Prediction of risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. N Engl J Med. in press.)、それらの多型群の中には高血圧の候補遺伝子も含まれていた。そこで、これらのSNPと高血圧との関連について大規模関連解析を行った。その結果、高血圧と関連するSNPを男性で4個、女性で4個同定することに成功した。更に、これらの多型を組み合わせて解析する多項ロジスティック回帰分析のstepwise forward selection methodにより、最大オッズ比が男性で5.34、女性で46.86を呈し、過去に報告された関連解析の中で最大のオッズ比を示した。この結果から、これらのSNPの中から複数のSNPを選択し、各SNPを解析した結果を組み合わせて用いれば、信頼性が高く、予知確率の高い高血圧のリスク診断が行えるとの知見が得られた。本発明は以上の知見に基づくものであって、次の構成を提供する。

[1] 以下の工程(a)を含んでなる、核酸試料の遺伝子型を検出する方法、

(a) 核酸試料における、以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程、

- (1) グリコプロテインIa遺伝子の塩基番号1648位の多型、
- (2) ケモカイン受容体2遺伝子の塩基番号190位の多型、
- (3) アポリポプロテインC-III遺伝子の塩基番号1100位の多型、及び
- (4) G-タンパク質  $\beta$ 3サブユニット遺伝子の塩基番号825位の多型。

[2] 以下の工程(b)を含んでなる、核酸試料の遺伝子型を検出する方法、

(b) 核酸試料における、以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程、

- (5) 腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の塩基番号-850位の多型、
- (6) 腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の塩基番号-238位の多型、
- (7) インスリン受容体サブストレート1遺伝子の塩基番号3494位の多型、及び
- (8) グリコプロテインIb  $\alpha$  遺伝子の塩基番号1018位の多型。

[3] 以下の工程(i)～(iii)を含んでなる、高血圧のリスク診断方法、

(i) 核酸試料における、以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程、

- (1) グリコプロテインIa遺伝子の塩基番号1648位の多型、
- (2) ケモカイン受容体2遺伝子の塩基番号190位の多型、
- (3) アポリポプロテインC-III遺伝子の塩基番号1100位の多型、及び
- (4) G-タンパク質  $\beta$ 3サブユニット遺伝子の塩基番号825位の多型、

(ii) 前記工程によって得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定する工程、及び

(iii) 決定された遺伝子型から高血圧の遺伝的リスクを求める工程。

[4] 以下の工程(iv)～(vi)を含んでなる、高血圧のリスク診断方法、

(iv) 核酸試料における、以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程、

- (5) 腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の塩基番号-850位の多型、
- (6) 腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の塩基番号-238位の多型、
- (7) インスリン受容体サブストレート1遺伝子の塩基番号3494位の多型、及び
- (8) グリコプロテインIb  $\alpha$  遺伝子の塩基番号1018位の多型、

(v) 前記工程によって得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定する工程、及び

(vi) 決定された遺伝子型から高血圧の遺伝的リスクを求める工程。

[5] 以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の核酸を含んでなる遺伝子型検出用キット、

(1) グリコプロテインIa遺伝子の塩基番号1648位の多型を解析するための核酸

(2) ケモカイン受容体2遺伝子の塩基番号190位の多型を解析するための核酸、

(3) アポリポプロテインC-III遺伝子の塩基番号1100位の多型を解析するための核酸、及び

(4) G-タンパク質  $\beta$ 3サブユニット遺伝子の塩基番号825位の多型を解析するための核酸。

[6] 以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の核酸を含んでなる遺伝子型検出用キット、

(5) 腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の塩基番号-850位の多型を解析するための核酸、

(6) 腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の塩基番号-238位の多型を解析するための核酸、

(7) インスリン受容体サブストレート1遺伝子の塩基番号3494位の多型を解析するための核酸、及び

(8) グリコプロテインIb  $\alpha$  遺伝子の塩基番号1018位の多型を解析するための核酸。

[7] 以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の核酸が不溶性支持体に固定されてなる固定化核酸、

(1) グリコプロテインIa遺伝子の塩基番号1648位の多型を解析するための核酸

(2) ケモカイン受容体2遺伝子の塩基番号190位の多型を解析するための核酸、

(3) アポリポプロテインC-III遺伝子の塩基番号1100位の多型を解析するための核酸、及び

(4) G-タンパク質  $\beta$ 3サブユニット遺伝子の塩基番号825位の多型を解析するための核酸。

[8] 以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の核酸が不溶性支持体に固定されてなる固定化核酸、

(5) 腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の塩基番号-850位の多型を解析するための核酸、

(6) 腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の塩基番号-238位の多型を解析するための核酸、

(7) インスリン受容体サブストレート1遺伝子の塩基番号3494位の多型を解析するための核酸、及び

(8) グリコプロテインIb  $\alpha$  遺伝子の塩基番号1018位の多型を解析するための核酸。

## 【0006】

## 【発明の実施の形態】

本発明の第1の局面は核酸試料の遺伝子型を検出する方法に関し、その一態様は以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程を含むことを特徴とする。他の態様としては、以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程を含むことを特徴とする。尚、以上の工程の結果得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定することにより高血圧の遺伝的リスクを求めることができる。

(1)グリコプロテインIa (Glycoprotein Ia) 遺伝子の塩基番号1648位の多型：1648A→G (以下、「GPIa(1648A→G)多型」ともいう)

(2)ケモカイン受容体2 (Chemokine receptor 2) 遺伝子の塩基番号190位の多型：190G→A (以下、「CCR2(190G→A)多型」ともいう)

(3)アポリポプロテインC-III (Apolipoprotein C-III) 遺伝子の塩基番号1100位の多型：1100C→T (以下、「ApoC-III(1100C→T)多型」ともいう)

(4)G-タンパク質 $\beta$ 3サブユニット (G-protein  $\beta$ 3 subunit) 遺伝子の塩基番号825位の多型：825C→T (以下、「GP $\beta$ 3(825C→T)多型」ともいう)

(5)腫瘍壊死因子 $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ ) 遺伝子の塩基番号-850位の多型：-850C→T (以下、「TNF $\alpha$ (-850C→T)多型」ともいう)

(6)腫瘍壊死因子 $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ ) 遺伝子の塩基番号-238位の多型：-238G→A (以下、「TNF $\alpha$ (-238G→A)多型」ともいう)

(7)インスリン受容体サブストレート1 (Insulin receptor substrate-1) 遺伝子の塩基番号3494位の多型：3494G→A (以下、「IRS-1(3494G→A)多型」ともいう)

(8)グリコプロテインIb $\alpha$  (Glycoprotein Ib $\alpha$ ) 遺伝子の塩基番号1018位の多型：1018C→T (以下、「GPIb $\alpha$ (1018C→T)多型」ともいう)

## 【0007】

以上において1648A→Gのような表記は、当該塩基番号位置の多型が矢印の前又は後の塩基である二つの遺伝子型からなることを意味する。

## 【0008】

各遺伝子における塩基番号は公共のデータベースであるGenBank (NCBI) に登録されている公知の配列を基準として表される。尚、配列番号1の塩基配列 (Accession No. X17033 M28249: Human mRNA for integrin alpha-2 subunit) において1648番目の塩基がグリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基に相当する。同様に配列番号2の塩基配列 (Accession No. U95626: Homo sapiens ccr2b (ccr2), ccr2a (ccr2), ccr5 (ccr5) and ccr6(ccr6) genes, complete cds, and lactoferrin (lactoferrin) gene, partial cds, complete sequence (但し、配列番号2の配列は50,000番目までの配列)) において46295番目の塩基がケモカイン受容体2遺伝子の190位塩基に相当し、配列番号3の塩基配列 (Accession No. X01392: Human apolipoprotein CIII gene and apo AI-apo CIII intergenic) において1100番目の塩基がアポリポプロテインC-III遺伝子の1100位塩基に相当し、配列番号4の塩基配列 (Accession No. M31328: Human guanine nucleotide-binding protein beta-3 subunit mRNA, complete cds.) において831番目の塩基がG-タンパク質 $\beta$ 3サブユニット遺伝子の825位塩基に相当し、配列番号5の塩基配列 (Accession No. L11698: Homo sapiens tumor necrosis factor alpha gene, promoter region.) において203番目の塩基が腫瘍壊死因子 $\alpha$ 遺伝子の-850位塩基に相当し、配列番号5の塩基配列 (Accession No. L11698: Homo sapiens tumor necrosis factor alpha gene, promoter region.) において816番目の塩基が腫瘍壊死因子 $\alpha$ 遺伝子の-238位塩基に相当し、配列番号6の塩基配列 (Accession No. S85963: hIRS-1=rat insulin receptor substrate-1 homolog [human, cell line FOCUS, Genomic, 6152 nt].) において3494番目の塩基がインスリン受容体サブストレート1遺伝子の塩基番号3494位塩基に相当し、配列番号7の塩基配列 (Accession No. J02940: Human platelet glycoprotein Ib alpha chain mRNA, complete cds.) において524番目の塩基がグリコプロテインIb $\alpha$ 遺伝子の1018位塩基に相当する。

#### 【0009】

本発明において「多型を解析する」とは、解析対象の遺伝子多型について核酸試料がどのような遺伝子型を有するかを調べることを意味し、多型が存在する位置の塩基（塩基配列）を調べることと同義である。典型的には、GPIa(1648A→G)多

型の解析を例に採れば、核酸試料におけるグリコプロテインIaの遺伝子型がAA（1648位塩基が両アレル共にAのホモ接合体）、AG（1648位塩基がAのアレルとGのアレルとのヘテロ接合体）、及びGG（1648位塩基が両アレル共にGのホモ接合体）の中のいずれであることを調べることを意味する。

#### 【0010】

上記の(1)～(4)の多型は、後述の実施例で示されるように、日本人男性を対象とした解析において高血圧の遺伝的リスクの判定に利用することが特に有効と認められた多型である。従ってこれらの多型を解析対象とすることは、被験者として男性（特に日本人男性）を採用するときに、より高精度で予知確率の高い診断を可能とする。

#### 【0011】

同様に上記の(5)～(8)の多型は、後述の実施例で示されるように、日本人女性を対象とした解析において高血圧の遺伝的リスクの判定に利用することが特に有効と認められた多型である。従ってこれらの多型を解析対象とすることは、被験者として女性（特に日本人女性）を採用するときに、より高精度で予知確率の高い診断を可能とする。

#### 【0012】

ここで、原則的には解析する多型の数の増加に比例して核酸試料の遺伝子型がより細かく分類され、これによって一層予知確率の高い高血圧の遺伝的リスクの診断を行うことができる。かかる見地から、上記の(1)～(4)の多型の中でより多くの多型を解析して遺伝子型を検出することが好ましい。従って、(1)～(4)のすべての多型を解析することが最も好ましい。三つ以下の多型を組み合わせる遺伝子型の検出を行う場合には、後述の実施例で示されるオッズ比の高い多型を優先的に選択して用いることが好ましい。例えば三つの多型を組み合わせる用いるのであれば、オッズ比が上位である三つの多型、即ち(2)、(3)、及び(4)を選択することが好ましい。同様に例えば二つの多型を組み合わせる用いるのであれば(2)及び(4)を選択することが好ましい。

#### 【0013】

(5)～(8)の多型から選択される二つ以上の多型を解析する場合も同様に、これ

らすべての多型、即ち四つの多型を解析することが最も好ましい。三つ以下の多型を組み合わせることで遺伝子型の検出を行う場合には、後述の実施例で示されるオッズ比の高い多型を優先的に選択して用いることが好ましい。例えば三つの多型を組み合わせるのであれば(5)、(7)、及び(8)を選択することが好ましい。同様に例えば二つの多型を組み合わせるのであれば(5)及び(7)を選択することが好ましい。

#### 【0014】

各遺伝子多型を解析する方法は特に限定されるものではなく例えばアレル特異的プライマー（及びプローブ）を用い、PCR法による増幅、及び増幅産物の多型を蛍光又は発光によって解析する方法や、PCR(polymerase chain reaction)法を利用したPCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism: 制限酵素断片長多型)法、PCR-SSCP(single strand conformation polymorphism: 単鎖高次構造多型)法(Orita, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 86, 2766-2770 (1989)等)、PCR-SSO(specific sequence oligonucleotide: 特異的配列オリゴヌクレオチド)法、PCR-SSO法とドットハイブリダイゼーション法を組み合わせたASO(allele specific oligonucleotide: アレル特異的オリゴヌクレオチド)ハイブリダイゼーション法(Saiki, Nature, 324, 163-166(1986)等)、又はTaqMan-PCR法(Livak, KJ, Genet Anal, 14, 143(1999), Morris, T. et al., J. Clin. Microbiol., 34, 2933(1996)), Invader法(Lyamichiev V et al., Nat Biotechnol, 17, 292 (1999)), プライマー伸長法を用いたMALDI-TOF/MS(matrix)法(Haff LA, Smirnov IP, Genome Res 7, 378(1997)), RCA(rolling cycle amplification)法(Lizardi PM et al., Nat Genet 19, 225(1998)), DNAチップ又はマイクロアレイを用いた方法(Wang DG et al., Science 280, 1077(1998)等)、プライマー伸長法、サザンブロットハイブリダイゼーション法、ドットハイブリダイゼーション法(Southern, E., J. Mol. Biol. 98, 503-517(1975))等、公知の方法を採用できる。さらに、解析対象の多型部分を直接シーケンスすることにより解析してもよい。尚、これらの方法を任意に組み合わせることで多型解析を行ってもよい。

#### 【0015】

核酸試料が少量の場合には検出感度ないし精度の面からPCR法を利用した方法

(例えばPCR-RFLP法)により解析することが好ましい。また、PCR法又はPCR法を応用した方法などの遺伝子増幅法により核酸試料を予め増幅(核酸試料の一部領域の増幅を含む)した後、上記いずれかの解析方法を適用することもできる。

一方、多数の核酸試料を解析する場合には、アリル特異的PCR法、アリル特異的ハイブリダイゼーション法、TaqMan-PCR法、Invader法、プライマー伸長法を用いたMALDI-TOF/MS(matrix)法、RCA(rolling cycle amplification)法、又はDNAチップ又はマイクロアレイを用いた方法等、多数の検体を比較的短時間で解析することが可能な解析方法を用いることが特に好ましい。

#### 【0016】

以上の方法では、各方法に応じたプライマーやプローブ等の核酸(本発明において、「多型解析用核酸」ともいう)が使用される。多型解析用核酸の例としては、解析対象の多型を含む遺伝子において、当該多型部位を含む一定領域(部分DNA領域)に相補的な配列を有する核酸を挙げることができる。また、解析対象の多型を含む遺伝子において当該多型部位を含む一定領域(部分DNA領域)に相補的な配列を有し、当該多型部分を含むDNAフラグメントを特異的に増幅できるように設計された核酸(プライマー)を挙げることができる。このような核酸としては、例えばグリコプロテインIa遺伝子の1648位の多型が解析対象の場合には1648位の塩基がA(アデニン)であるグリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、又は1648位の塩基がG(グアニン)であるグリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸が該当する。

#### 【0017】

多型解析用核酸の他の具体例としては、解析対象の多型部位がいずれかの遺伝子型である場合にのみ当該多型部位を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットを挙げることができる。より具体的には解析対象の多型部位を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、多型部位がいずれかの遺伝子型であるアンチセンス鎖の当該多型部位を含む部分DNA領域に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、センス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーとか



らなる核酸セットを例示することができる。このような核酸セットとしてはグリコプロテインIa遺伝子の1648位の多型が解析対象の場合には、グリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、1648位塩基がA（アデニン）であるグリコプロテインIa遺伝子のアンチセンス鎖において1648位塩基を含む部分DNA領域に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、センス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーとからなる核酸セット、又は1648位塩基がG（グアニン）であるグリコプロテイン遺伝子のアンチセンス鎖において1648位塩基を含む部分DNA領域に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、センス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーとからなる核酸セットが該当する。ここで、増幅される部分DNA領域の長さはその検出に適した範囲で適宜設定され例えば50bp～200bp、好ましくは80bp～150bpである。より具体的には例えば、GPIa(1648A→G)多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。尚、以下の配列の下線部は多型に対応する部分を表す。また、配列中のNはA、T、C、及びGのいずれかであることを意味する。

**【0018】**

センスプライマー

GAGTCTACCTGTTTACTATCAANAA：配列番号8、又はGAGTCTACCTGTTTACTATCAANGA：配列番号9

アンチセンスプライマー

ACCAGTACTAAAGCAAATTAAACT：配列番号10

**【0019】**

同様に、CCR2(190G→A)多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

アンチセンスプライマー

GCAGTTTATTAAGATGAGGNCG：配列番号11、又はTTGCAGTTTATTAAGATGAGGNTG：配列番号12

センスプライマー

GGTGCTCCCTGTCATAAATTTGA: 配列番号 13

【0020】

同様に、ApoC-III(1100C→T)多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

センスプライマー

CCTTCTCAGCTTCATGCAGG: 配列番号 14、

アンチセンスプライマー

GTCTTGGTGGCGTGCTTCA: 配列番号 15

【0021】

同様に、GPβ3(825C→T)多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

センスプライマー

TCTGCGGCATCACGTNCG: 配列番号 16、又は

TCTGCGGCATCACGTNTG: 配列番号 17

アンチセンスプライマー

GAATAGTAGGCGGCCACTGA: 配列番号 18

【0022】

同様に、TNFα(-850C→T)多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

アンチセンスプライマー

TCTACATGGCCCTGTCTTNGT: 配列番号 19、又は

CTCTACATGGCCCTGTCTTNAT: 配列番号 20

センスプライマー

CTCTACATGGCCCTGTCTTTAT: 配列番号 21

【0023】

同様に、TNFα(-238G→A)多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

アンチセンスプライマー

CCCCATCCTCCCTGCTNCG: 配列番号 22、又は

CCCCATCCTCCCTGCTNIG: 配列番号 23

センスプライマー

AGTCAGTGGCCCAGAAGACC: 配列番号 24

【0024】

同様に、IRS-1(3494G→A)多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

センスプライマー

GGGCCCTGCACCTCCNGG: 配列番号 25、又は

GGGCCCTGCACCTCCNAG: 配列番号 26

アンチセンスプライマー

GGGTAGGCCTGCAAATGCTA: 配列番号 27

【0025】

同様に、GPIb $\alpha$  (1018C→T)多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

センスプライマー

CCCAGGGCTCCTGNCG: 配列番号 28、又は

CCCCAGGGCTCCTGNTG: 配列番号 29

アンチセンスプライマー

TGAGCTTCTCCAGCTTGGGTG: 配列番号 30

【0026】

一方、プローブの具体例として以下のものを挙げることができる。

ApoC-III(1100C→T)多型解析用プローブとして

CAGCTTCATGCAGGGCTACA: 配列番号 31、又は

CAGCTTCATGCAGGGTTACA: 配列番号 32。

【0027】

TNF $\alpha$  (-850C→T)多型解析用プローブとして

ACATGGCCCTGTCTTNGTTAAG: 配列番号 33、又は

ACATGGCCCTGTCTTNATTAAG: 配列番号 34。

【0028】

IRS-1(3494G→A)多型解析用プローブとして

CACCTCCNGGGGCTGCTAG: 配列番号 35、又は

CACCTCCNAGGGCTGCTAG: 配列番号 36。

#### 【0029】

以上の核酸プライマー、核酸プローブは単なる一例であって、核酸プライマーであれば目的の増幅反応を支障なく行える限度において、他方核酸プローブであれば目的のハイブリダイゼーション反応を支障なく行える限度において一部の塩基配列に改変が施されたものであってもよい。ここでの「一部の改変」とは、塩基の一部が欠失、置換、挿入及び／又は付加されていることを意味する。改変にかかる塩基数は例えば1～7個、好ましくは1～5個、更に好ましくは、1～3個である。尚、このような改変は、原則として多型部位に対応する塩基以外の部分において行われる。

#### 【0030】

多型解析用核酸（プローブ、プライマー）には、解析方法に応じて適宜DNA断片又はRNA断片が用いられる。多型解析用核酸の塩基長はそれぞれの機能が発揮される長さであればよく、プライマーとして用いられる場合の塩基長の例としては10～50bp程度、好ましくは15～40bp程度、更に好ましくは15～30bp程度である。

尚、プライマーとして用いられる場合には増幅対象に特異的にハイブリダイズし、目的のDNAフラグメントを増幅することができる限り鋳型となる配列に対して多少のミスマッチがあってもよい。プローブの場合も同様に、検出対象の配列と特異的なハイブリダイズが行える限り、検出対象の配列に対して多少のミスマッチがあってもよい。ミスマッチの程度としては、1～数個、好ましくは1～5個、更に好ましくは1～3個である。

多型解析用核酸（プライマー、プローブ）はホスホジエステル法など公知の方法によって合成することができる。尚、多型解析用核酸の設計、合成等に関しては成書（例えばMolecular Cloning, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）を参考にすることができる。

#### 【0031】

本発明における多型解析用核酸を予め標識物質で標識しておくことができる。このような標識化核酸を用いることにより例えば、増幅産物の標識量を指標として多型の解析を行うことができる。また、多型を構成する各遺伝子型の遺伝子における部分DNA領域をそれぞれ特異的に増幅するように設計された2種類のプライマーを互いに異なる標識物質で標識しておけば、増幅産物から検出される標識物質及び標識量によって核酸試料の遺伝子型を判別できる。このような標識化プライマーを用いた検出方法の具体例としては、多型を構成する各遺伝子型のセンス鎖にそれぞれ特異的にハイブリダイズする2種類の核酸プライマー（アリル特異的センスプライマー）をフルオレセインイソチオシアネートとテキサスレッドでそれぞれ標識し、これら標識化プライマーとアンチセンス鎖に特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーとを用いて多型部位を含む部分DNA領域を増幅し、得られた増幅産物における各蛍光物質の標識量を測定して多型を検出する方法を挙げることができる。尚、ここでのアンチセンスプライマーを例えばビオチンで標識しておけば、ビオチンとアビジンとの特異的な結合を利用して増幅産物の分離を行うことができる。

#### 【0032】

多型解析用核酸の標識に用いられる標識物質としては $^{32}\text{P}$ などの放射性同位元素、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、テキサスレッドなどの蛍光物質を例示でき、標識方法としてはアルカリフォスファターゼ及びT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いた5'末端標識法、T4 DNAポリメラーゼやKlenow断片を用いた3'末端標識法、ニックトランスレーション法、ランダムプライマー法（Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 9, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）などを例示できる。

以上の多型解析用核酸を不溶性支持体に固定化した状態で用いることもできる。固定化に使用する不溶性支持体をチップ状、ビーズ状などに加工しておけば、これら固定化核酸を用いて多型の解析をより簡便に行うことができる。

#### 【0033】

核酸試料は、被験者の血液、皮膚細胞、粘膜細胞、毛髪等から公知の抽出方法、精製方法を用いて調製することができる。多型解析対象の遺伝子を含むもので

あれば、任意の長さのゲノムDNAを核酸試料として用いることができる。また、必ずしも解析対象の遺伝子のすべてが一の核酸上に存在する核酸試料を用いる必要はない。即ち、本発明の核酸試料としては、解析対象の遺伝子のすべてが一の核酸上に存在しているもの、解析対象の遺伝子が二以上の核酸上に分かれて存在しているもののいずれをも用いることができる。尚、核酸試料において解析対象の遺伝子が完全な状態（即ち、遺伝子の全長が存在する状態）でなくても、少なくとも解析される多型部位が存在している限りにおいて断片的、部分的な状態であってもよい。

#### 【0034】

各遺伝子多型の解析は遺伝子多型ごとに、又は複数若しくは全部を同時に行う。前者の場合としては例えば、被験者から得た核酸試料を解析対象の多型の数に合わせて分注し、各多型の解析を個別に行う。後者の場合としては例えば、DNAチップまたはマイクロアレイによって行うことができる。尚、ここでいう同時とは解析過程のすべての操作が同時に行われることのみを意味するのではなく、一部の操作（例えば核酸増幅操作、プローブのハイブリダイズ、又は検出）が同時に行われる場合も含む。

#### 【0035】

解析対象の遺伝子の転写産物であるmRNAを利用して各遺伝子の多型を解析することもできる。例えば被験者の血液、尿等から解析対象である遺伝子のmRNAを抽出、精製した後、ノーザンブロット法（Molecular Cloning, Third Edition, 7.42, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）、ドットブロット法（Molecular Cloning, Third Edition, 7.46, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）、RT-PCR法（Molecular Cloning, Third Edition, 8.46, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）、DNAチップ（DNAアレイ）を用いた方法などを実行することにより、mRNAを出発材料として多型解析を行うことができる。

#### 【0036】

さらに、上記の多型の中でアミノ酸の変化を伴うものについては、解析対象の遺伝子の発現産物を用いて多型解析を行うこともできる。この場合、多型部位に

対応するアミノ酸を含んでいる限り、部分タンパク質、部分ペプチドであっても解析用試料として用いることができる。

#### 【0037】

このような遺伝子の発現産物を用いて解析する方法としては、多型部位のアミノ酸を直接分析する方法、又は立体構造の変化を利用して免疫学的に分析する方法などが挙げられる。前者としては、周知のアミノ酸配列分析法（エドマン法を利用した方法）を用いることができる。後者としては、多型を構成するいずれかの遺伝子型を有する遺伝子の発現産物に特異的な結合活性を有するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を用いた、ELISA法（酵素結合免疫吸着定量法）、ラジオイムノアッセイ、免疫沈降法、免疫拡散法等などを用いることができる。

#### 【0038】

以上説明した本発明の検出方法を実行することにより得られる多型情報を、高血圧の遺伝的リスクの診断に利用することができる。即ち、本発明は以上の検出方法によって得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定する工程、及び決定された核酸試料の遺伝子型から遺伝的リスクを求める工程を含んでなる、高血圧のリスク診断方法も提供する。ここでの遺伝子型の決定は、典型的には、検出対象の多型に関して核酸試料の両アレルがいずれの遺伝子型をそれぞれ有するかを決定することである。GPIa(1648A→G)多型が検出対象である場合を例に採れば、典型的には核酸試料におけるGPIaの遺伝子型がAA（1648位塩基が両アレル共にAのホモ接合体）、AG（1648位塩基がAのアレルとGのアレルとのヘテロ接合体）、及びGG（1648位塩基が両アレル共にGのホモ接合体）の中のいずれであるかを決定することである。

#### 【0039】

後述の実施例で得られた結果を考慮すれば、高精度かつ予知確率の高い高血圧の遺伝的リスクの診断を可能とするために、例えばGPIa(1648A→G)多型であれば核酸試料の遺伝子型がGGであるか、それともAA又はAGのいずれかであるかが決定される。同様にCCR2(190G→A)多型であればAAであるか、それともGG又はGAのいずれかであるか、ApoC-III(1100C→T)多型であればTTであるか、それともCC又は

CTのいずれかであるか、GP $\beta$ 3(825C→T)多型であればCT又はTTのいずれかであるか、それともCCであるか、TNF $\alpha$ (-850C→T)多型であればTTであるか、それともC又はCTのいずれかであるか、TNF $\alpha$ (-238G→A)多型であればGA又はAAのいずれかであるか、それともGGであるか、IRS-1(3494G→A)多型であればGA又はAAのいずれかであるか、それともGGであるか、GPIIb $\alpha$ (1018C→T)多型であればCT又はTTのいずれかであるか、それともCCであるかが決定される。

#### 【0040】

高血圧の遺伝的リスクを診断することにより、将来的に高血圧を罹患するおそれの程度（発症し易さ）、即ち発症リスク（発症脆弱性）が予測され、また遺伝子型という客観的指標に基づいて高血圧の認定や病状の把握を行うことが可能となる。換言すれば、本発明の診断方法によって高血圧の発症リスクの評価、高血圧に罹患していることの認定、又は症状の把握を行うことができる。中でも発症リスクの評価を行えることは臨床上極めて有意義である。発症リスクを事前に知るとは高血圧の一次予防に貢献し、適切な予防措置を講じることを可能とするからである。

本発明の診断方法によって得られる情報は、適切な治療法の選択や、予後の改善、患者のQOL（クオリティー・オブ・ライフ）の向上、又は発症リスクの低減などに利用することができる。

#### 【0041】

本発明の診断方法を実行することにより、高血圧の発症リスク等をモニターすることができる。このようなモニターの結果、ある外的因子（環境因子、薬剤の投与など）と発症リスク等の増加との間に相関関係が認められれば、当該外的因子を危険因子と認定し、この情報を基に発症リスク等の低減を図ることが可能と考えられる。

#### 【0042】

本発明で得られる高血圧の発症に関連する遺伝情報は高血圧の治療（予防的処置を含む）に利用され得る。例えば、本発明の診断方法を実施した結果、解析対象の高血圧の発症リスクを高める遺伝子型であった場合に、発症リスクの低い遺伝子型を有する遺伝子を生体内に導入して発現させれば、当該遺伝子が発現する



ことによって症状の軽減、発症の抑制、発症リスクの軽減などを期待できる。発症リスクの高い遺伝子型を有する遺伝子のmRNAに対するアンチセンス鎖を導入し、当該mRNAの発現を抑制する方法によっても、同様の治療効果が期待される。

#### 【0043】

遺伝子又はアンチセンス鎖の導入は例えば、遺伝子導入用プラスミド又はウイルスベクターを用いた方法、エレクトロポレーション(Potter, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 7161-7165(1984))、超音波マイクロバブル(Lawrie, A., et al. Gene Therapy 7, 2023-2027 (2000))、リポフェクション(Felgner, P.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 7413-7417(1984))、マイクロインジェクション(Graessmann, M. & Graessmann, A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 366-370(1976))等の方法により行うことができる。これらの方法を利用して所望の遺伝子などを生体に対して直接的に導入(in vivo法)又は間接的に導入(ex vivo法)することができる。

#### 【0044】

本発明の第2の局面は、上述した本発明の検出方法又は診断方法に使用されるキット(遺伝子型検出用キット、又は高血圧診断用キット)を提供する。かかるキットには上記の(1)~(4)の多型からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析するための核酸(多型解析用核酸)が含まれる。他の態様としては上記の(5)~(8)の多型からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析するための核酸(多型解析用核酸)を含んでキットが構築される。

多型解析用核酸は、それが適用される解析方法(上述したアリル特異的核酸等を用いたPCR法を利用する方法、PCR-RFLP法、PCR-SSCP、TaqMan-PCR法、Invader法等)において、解析対象の多型部分を含むDNA領域又はそれに対応するmRNAを特異的に増幅できるもの(プライマー)又は特異的に検出できるもの(プローブ)として設計される。以下に本発明において提供されるキットの具体例を示す。

#### 【0045】

以下の(1)~(4)からなるグループより選択される二つ以上の核酸を含んでなる遺伝子型検出用キット、

(1)1648位塩基がAであるグリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基を含む部分DN

A領域に相補的な配列を有する核酸、又は1648位塩基がGであるグリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、

(2)190位塩基がGであるケモカイン受容体2遺伝子の190位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、又は190位がAであるケモカイン受容体2遺伝子の190位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、

(3)1100位がCであるアポリポプロテインC-III遺伝子の1100位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、又は1100位塩基がTであるアポリポプロテインC-III遺伝子遺伝子の1100位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、及び

(4)825位塩基がCであるG-タンパク質 $\beta$ 3サブユニット遺伝子の825位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、又は825位塩基がTであるG-タンパク質 $\beta$ 3サブユニット遺伝子の-482位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸。

以上では、(1)～(4)からなるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成しているが、(1)～(4)の中から二つ以上を任意に選択してグループとし、かかるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成してもよい。例えば(2)～(4)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が上位3位までの多型を解析するための核酸）より二つ以上の核酸を選択してキットを構成することができる。

#### 【0046】

以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の核酸を含んでなる遺伝子型検出用キット、

(5)-850位塩基がCである腫瘍壊死因子 $\alpha$ 遺伝子の-850位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、又は-850位塩基がTである腫瘍壊死因子 $\alpha$ 遺伝子の-850位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、

(6)-238位塩基がGである腫瘍壊死因子 $\alpha$ 遺伝子の-238位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、又は-238位塩基がAである腫瘍壊死因子 $\alpha$ 遺伝子の-238位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、

(7)3494位塩基がGであるインスリン受容体サブストレート1遺伝子の3494位塩

基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、又は3494位塩基がAであるインスリン受容体サブストレート1遺伝子の3494位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、及び

(8)1018位塩基がCであるグリコプロテインIb $\alpha$ 遺伝子の1018位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、又は1018位塩基がTであるグリコプロテインIb $\alpha$ 遺伝子の1018位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸。

以上では、(5)～(8)からなるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成しているが、(5)～(8)の中から二つ以上を任意に選択してグループとし、かかるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成してもよい。例えば(5)、(7)、及び(8)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が上位3位までの多型を解析するための核酸）より二つ以上の核酸を選択してキットを構成することができる。

#### 【0047】

以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の核酸セットを含んでなる遺伝子型検出用キット、

(1)核酸試料中のグリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基がAである場合にのみ、該グリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のグリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基がGである場合にのみ、該グリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、

(2)核酸試料中のケモカイン受容体2遺伝子の190位塩基がGである場合にのみ、該ケモカイン受容体2遺伝子の190位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のケモカイン受容体2遺伝子の190位塩基がAである場合にのみ、該ケモカイン受容体2遺伝子の190位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、

(3)核酸試料中のアポリポプロテインC-III遺伝子の1100位塩基がCである場合にのみ、該アポリポプロテインC-III遺伝子の1100位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のアポリポプロテインC-III遺伝子の1100位塩基がTである場合にのみ、アポリポプロテインC-III

遺伝子の1100位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、及び

(4)核酸試料中のG-タンパク質  $\beta$ 3サブユニット遺伝子の825位塩基がCである場合にのみ、該G-タンパク質  $\beta$ 3サブユニット遺伝子の825位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のG-タンパク質  $\beta$ 3サブユニット遺伝子の825位塩基がTである場合にのみ、該G-タンパク質  $\beta$ 3サブユニット遺伝子の825位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット。

以上では、(1)～(4)からなるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成しているが、(1)～(4)の中から二つ以上を任意に選択してグループとし、かかるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成してもよい。例えば(2)～(4)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が上位3位までの多型を解析するための核酸）より二つ以上の核酸を選択してキットを構成することができる。

#### 【0048】

以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の核酸セットを含んでなる遺伝子型検出用キット、

(5)核酸試料中の腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の-850位塩基がCである場合にのみ、該腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の-850位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中の腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の-850位塩基がTである場合にのみ、該腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の-850位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、

(6)核酸試料中の腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の-238位塩基がGである場合にのみ、該腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の-238位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中の腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の-238位塩基がAである場合にのみ、該腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の-238位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、

(7)核酸試料中のインスリン受容体サブストレート1遺伝子の3494位塩基がGである場合にのみ、該インスリン受容体サブストレート1遺伝子の3494位塩基を含

む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のインスリン受容体サブストレート1遺伝子の3494位塩基がAである場合にのみ、該インスリン受容体サブストレート1遺伝子の3494位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、及び

(8)核酸試料中のグリコプロテインIb $\alpha$  遺伝子の1018位塩基がCである場合にのみ、該グリコプロテインIb $\alpha$  遺伝子の1018位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のグリコプロテインIb $\alpha$  遺伝子の1018位塩基がTである場合にのみ、該グリコプロテインIb $\alpha$  遺伝子の1018位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット。

以上では、(5)～(8)からなるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成しているが、(5)～(8)の中から二つ以上を任意に選択してグループとし、かかるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成してもよい。例えば(5)、(7)、及び(8)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が上位3位までの多型を解析するための核酸）より二つ以上の核酸を選択してキットを構成することができる。

#### 【0049】

以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の核酸セットを含んでなる遺伝子型検出用キット、

(1)グリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、1648位塩基がAであるグリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマー及び／又は1648位塩基がGであるグリコプロテインIa遺伝子において1648位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、グリコプロテインIa遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、からなる核酸セット、

(2)ケモカイン受容体2遺伝子の190位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、190位塩基がGであるケモカイン受容体2遺伝子において190位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマー及び／又は190位塩基がAであるケモカイン受容体

2遺伝子において190位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、ケモカイン受容体2遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、からなる核酸セット、

(3) アポリポrotein C-III 遺伝子の1100位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、及び

(4) G-タンパク質  $\beta 3$  サブユニット 遺伝子の825位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、825位塩基がCであるG-タンパク質  $\beta 3$  サブユニット 遺伝子において825位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマー及び／又は825位塩基がTであるG-タンパク質  $\beta 3$  サブユニット 遺伝子において825位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、G-タンパク質  $\beta 3$  サブユニット 遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、からなる核酸セット。

以上では、(1)～(4)からなるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成しているが、(1)～(4)の中から二つ以上を任意に選択してグループとし、かかるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成してもよい。例えば(2)～(4)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が上位3位までの多型を解析するための核酸）より二つ以上の核酸を選択してキットを構成することができる。

#### 【0050】

以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の核酸セットを含んでなる遺伝子型検出用キット、

(5) 腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の-850位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、-850位塩基がCである腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子において-850位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマー及び／又は-850位塩基がTである腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子において-850位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、からなる核酸セット、

(6) 腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の-238位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、-238位塩基がGである腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子において-238位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマー及び／又は-238位塩基がAである腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子において-238位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、からなる核酸セット、

(7) インスリン受容体サブストレート1遺伝子の3494位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、3494位塩基がGであるインスリン受容体サブストレート1遺伝子において3494位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマー及び／又は3494位塩基がAであるインスリン受容体サブストレート1遺伝子において3494位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、インスリン受容体サブストレート1遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、からなる核酸セット、及び

(8) グリコプロテインIb  $\alpha$  遺伝子の1018位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、1018位塩基がCであるグリコプロテインIb  $\alpha$  遺伝子において1018位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマー及び／又は1018位塩基がTであるグリコプロテインIb  $\alpha$  遺伝子において1018位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、グリコプロテインIb  $\alpha$  遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、からなる核酸セット。

以上では、(5)～(8)からなるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成しているが、(5)～(8)の中から二つ以上を任意に選択してグループとし、かかるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成してもよい。例えば(5)、(7)、及び(8)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が上位3位までの多型を解析するための核酸）より二つ以上の核酸を選択してキットを構成することができる。

## 【0051】

以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の核酸セットを含んでなる遺伝子型検出用キット、

(1)1648位塩基がAであるグリコプロテインIa遺伝子のアンチセンス鎖において1648位塩基に対応する塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第1の標識物質で標識された第1核酸と、1648位塩基がGであるグリコプロテインIa遺伝子のアンチセンス鎖において1648位塩基に対応する塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第2の標識物質で標識された第2核酸と、及びグリコプロテインIa遺伝子のセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第1核酸又は前記第2核酸とともに使用されてグリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅することが可能な第3核酸と、からなる核酸セット、

(2)190位塩基がGであるケモカイン受容体2遺伝子のセンス鎖において190位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第1の標識物質で標識された第1核酸と、190位塩基がAであるケモカイン受容体2遺伝子のセンス鎖において190位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第2の標識物質で標識された第2核酸と、及びケモカイン受容体2遺伝子のアンチセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第1核酸又は前記第2核酸とともに使用されてケモカイン受容体2遺伝子の190位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅することが可能な第3核酸と、からなる核酸セット、

(3)アポリポプロテインC-III遺伝子の1100位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された第1核酸及び第2核酸と、1100位がCであるアポリポプロテインC-III遺伝子を鋳型として前記第1核酸及び前記第2核酸を用いて増幅される核酸に対して特異的にハイブリダイズし且つ第1の標識物質で標識された第3核酸と、及び1100位がTであるアポリポプロテインC-III遺伝子を鋳型として前記第1核酸及び前記第2核酸を用いて増幅される核酸に対して特異的にハイブリダイズし且つ第2の標識物質で標識された第4核酸と、からなる核酸セット、

(4)825位塩基がCであるG-タンパク質 $\beta$ 3サブユニット遺伝子のアンチセンス鎖



において825位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第1の標識物質で標識された第1核酸と、825位塩基がTであるG-タンパク質 $\beta$ 3サブユニット遺伝子のアンチセンス鎖において825位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第2の標識物質で標識された第2核酸と、及びG-タンパク質 $\beta$ 3サブユニット遺伝子のセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第1核酸又は前記第2核酸とともに使用されてG-タンパク質 $\beta$ 3サブユニット遺伝子の825位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅することが可能な第3核酸と、からなる核酸セット。

以上では、(1)～(4)からなるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成しているが、(1)～(4)の中から二つ以上を任意に選択してグループとし、かかるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成してもよい。例えば(2)～(4)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が上位3位までの多型を解析するための核酸）より二つ以上の核酸を選択してキットを構成することができる。

#### 【0052】

以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の核酸セットを含んでなる遺伝子型検出用キット、

(5)-850位塩基がCである腫瘍壊死因子 $\alpha$ 遺伝子のセンス鎖において-850位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第1の標識物質で標識された第1核酸と、-850位塩基がTである腫瘍壊死因子 $\alpha$ 遺伝子のセンス鎖において-850位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第2の標識物質で標識された第2核酸と、及び腫瘍壊死因子 $\alpha$ 遺伝子のアンチセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第1核酸又は前記第2核酸とともに使用されて腫瘍壊死因子 $\alpha$ 遺伝子の-850位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅することが可能な第3核酸と、からなる核酸セット、

(6)-238位塩基がGである腫瘍壊死因子 $\alpha$ 遺伝子のセンス鎖において-238位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第1の標識物質で標識された第1核酸と、-238位塩基がAである腫瘍壊死因子 $\alpha$ 遺伝子のセンス鎖において-238位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第2の

標識物質で標識された第2核酸と、及び腫瘍壊死因子 $\alpha$ 遺伝子のアンチセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第1核酸又は前記第2核酸とともに使用されて腫瘍壊死因子 $\alpha$ 遺伝子の-238位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅することが可能な第3核酸と、からなる核酸セット、

(7) 3494位塩基がGであるインスリン受容体サブストレート1遺伝子のアンチセンス鎖において3494位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第1の標識物質で標識された第1核酸と、3494位塩基がAであるインスリン受容体サブストレート1遺伝子のアンチセンス鎖において3494位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第2の標識物質で標識された第2核酸と、及びインスリン受容体サブストレート1遺伝子のセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第1核酸又は前記第2核酸とともに使用されてインスリン受容体サブストレート1遺伝子の3494位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅することが可能な第3核酸と、からなる核酸セット、及び

(8) 1018位塩基がCであるグリコプロテインIb $\alpha$ 遺伝子のアンチセンス鎖において1018位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第1の標識物質で標識された第1核酸と、1018位塩基がTであるグリコプロテインIb $\alpha$ 遺伝子のアンチセンス鎖において1018位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第2の標識物質で標識された第2核酸と、及びグリコプロテインIb $\alpha$ 遺伝子のセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第1核酸又は前記第2核酸とともに使用されてグリコプロテインIb $\alpha$ 遺伝子の1018位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅することが可能な第3核酸と、からなる核酸セット。

以上では、(5)～(8)からなるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成しているが、(5)～(8)の中から二つ以上を任意に選択してグループとし、かかるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成してもよい。例えば(5)、(7)、及び(8)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が上位3位までの多型を解析するための核酸）より二つ以上の核酸を選択してキットを構成することができる。

【0053】

以上の各キットにおいては、キットの使用方法に応じた一又は二以上の試薬（バッファー、反应用試薬、検出用試薬など）などを組み合わせてもよい。

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明する。

#### 【0054】

##### 【実施例】

##### <実施例1> 遺伝子多型の選択

PubMed[National Center for Biological Information (NCBI)], Online Mendelian inheritance in Men (NCBI), Single Nucleotide Polymorphism (NCBI)などの数種類の公的データベースを用いて、今までに報告された遺伝子の中から血管生物学、血小板・白血球生物学、凝固線溶系、脂質・糖・その他の代謝因子などの総合的側面から冠動脈硬化、冠動脈攣縮、高血圧、糖尿病、高脂血症などとの関連が推定される71遺伝子を抜粋した。さらにこれらの遺伝子に存在する多型の中でプロモーター領域やエクソンに存在するもの、あるいはスプライスドナー部位やアクセプター部位に位置し、遺伝子産物の機能変化との関連が予想されるものを中心に112多型を選択した（図1及び図2）。

#### 【0055】

##### <実施例2> 遺伝子多型の決定

対象は1994年7月から2001年12月の間に参加15施設を受診（または入院）した日本人1940例（男性1107例、女性833例）である。高血圧例は1067例（男性574例、女性493例）で、収縮期血圧 $\geq 140$  mmHg または拡張期血圧 $\geq 90$  mmHg、あるいはその両方、であるか降圧薬を服用している症例である。冠動脈疾患、心臓弁疾患、先天性心血管疾患、または腎疾患・内分泌疾患など二次性高血圧を来す疾患を有する症例は除外した。対照は正常血圧（収縮期血圧 $< 140$  mmHg、拡張期血圧 $< 90$  mmHg）の873例（男性533例、女性340例）で、従来の冠動脈疾患危険因子、即ち喫煙（1日10本以上）、肥満（body mass index  $> 26$  kg/m<sup>2</sup>）、糖尿病（空腹時血糖  $> 126$  mg/dLまたはヘモグロビンA1c  $> 6.5\%$ 、あるいはその両方）、高脂血症（血清総コレステロール  $> 220$  mg/dL）、高尿酸血症（男性では血清尿酸  $> 7.7$  mg/dL、女性では血清尿酸  $> 5.5$  mg/dL）の少なくとも一つを有するが冠動脈疾患を有しない症例である。これらの対照は安静時心電図が正常であり、運動

負荷試験でも心筋の虚血性変化は認められなかった。血圧はアメリカ心臓協会のガイドラインに従い、座位で測定した (Perloff D, Grim C, Flack J, Frohlich ED, Hill M, McDonald M, Morgenstern BZ. Human blood pressure determination by sphygmomanometry. *Circulation*. 1993;88:2640-2470.)。

#### 【0056】

それぞれの対象から静脈血7 mLを50 mmol/L EDTA-2Naを含むチューブに採血し、ゲノムDNAをDNA抽出キット (Qiagen, Chatsworth, CA) を用いて抽出した。一塩基多型の遺伝子型の決定は蛍光・発光法によるアリルト異的プライマー・プローブ測定システム (東洋紡ジーンアナリシス、敦賀、日本) により行った (図3) 。多型部位を含むDNA断片は5'末端にfluorescein isothiocyanate (FITC) またはTexas red (TxR) で標識した2種類のアリルト異的センス (またはアンチセンス) プライマーと5'末端をビオチンで標識したアンチセンス (またはセンス) プライマーを用いてpolymerase chain reaction (PCR) により増幅した。また別法として、多型部位を含むDNA断片は2種類のアリルト異的センス (またはアンチセンス) プライマーと5'末端をビオチンで標識したアンチセンス (またはセンス) プライマーを用いて、またはセンスプライマーと5'末端をビオチンで標識したアンチセンスプライマーを用いてPCRにより増幅した。反応溶液 (25  $\mu$ L) には20 ngのDNA、5 pmolの各プライマー、0.2 mmol/Lの各デオキシヌクレオシド三リン酸、1-4 mmol/Lの塩化マグネシウム、1 UのDNAポリメラーゼ (rTaq or KODplus; 東洋紡、大阪、日本) を含み、それぞれのDNAポリメラーゼ緩衝液を用いた。増幅プロトコールは初期変性が95℃で5分、35-45サイクルで変性が95℃で30秒、アニーリングが55-67.5℃で30秒、伸展が72℃で30秒、そして最終伸展が72℃で2分とした。

#### 【0057】

蛍光法による遺伝子型の決定では、増幅したDNAを96穴プレートの各ウェルでストレプトアビジン結合磁気ビーズを含む溶液中で室温インキュベートした。このプレートを磁気スタンド上に置き、各ウェルから上清を採取し、0.01 M NaOHを含む96穴プレートの各ウェルに移した後、マイクロプレートリーダーによりFITCは励起・蛍光波長が485と538 nm、TxRは励起・蛍光波長が584と612 nmで蛍光

を測定した。また発光法による遺伝子型の決定では、増幅したDNAを0.3 M NaOHで変性させ、96穴プレートの各ウェルの底面に固定したいずれかのアリル特異的補足プローブと35-40% ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション緩衝液で37℃、30分間ハイブリダイゼーションを行った。ウェルを十分に洗浄した後、アルカリフォスファターゼ結合ストレプトアビジンを各ウェルに加え、プレートを37℃、15分間振騰した。ウェルを再度洗浄し、0.8 mM 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (monosodium salt)と0.4 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p-toluidine saltを含む溶液を加えた後、450 nmでの吸光度を測定した。

#### 【0058】

本方法による遺伝子型決定の精度を確認するために、50人のDNAサンプルを無作為に選びPCR-制限酵素断片長多型法またはPCR産物の直接塩基配列決定法を行った。いずれのサンプルにおいてもアリル特異的プライマー・プローブ測定システムにより決定された遺伝子型はPCR-制限酵素断片長多型法またはDNA塩基配列決定法によって決定されたものと同一であった。

#### 【0059】

以下の関連解析における統計解析は次のように行った。臨床データは高血圧例と対照との間でunpaired Student's t test または Mann-Whitney U testを用いて比較した。定性的データはchi-square testで検定した。アリル頻度はgene counting methodにより推定し、Hardy-Weinberg平衡から逸脱しているかどうかはchi-square testによって検定した。本発明者らは危険因子を補正した多項ロジスティック回帰分析を行った。高血圧を従属因子とし、年齢、body mass index (BMI)、喫煙状況 (0 = 非喫煙, 1 = 喫煙)、代謝因子 (0 = 糖尿病・高コレステロール血症・高尿酸血症の経歴なし, 1 = 経歴あり)、各多型の遺伝子型を独立因子とした。それぞれの遺伝子型はdominant (優性)、recessive (劣性)、additive (付加) 遺伝モデルで解析し、P値、オッズ比、95%信頼区間を算出した。組み合わせ遺伝子型解析では、ロジスティック回帰分析のstepwise forward selection method によりそれぞれの遺伝子型についてのオッズ比を算出した。

#### 【0060】

### <実施例3> 高血圧に関連する多型の選択、及び高血圧リスク診断法の開発

本発明者らは先の報告において71候補遺伝子112多型と心筋梗塞との関連解析を男性451例（心筋梗塞219例、対照232例）と女性458例（心筋梗塞226例、対照232例）について行った（Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, et al. Prediction of risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. N Engl J Med. in press.）。この研究により男性で19個、女性で18個の一塩基多型が心筋梗塞発症と関連することを見出したが、それらの多型群の中には高血圧の候補遺伝子も含まれていた（図1、図2、図4を参照）。本実施例ではこれらの一塩基多型と高血圧との関連について1940例の大規模関連解析を行った。

#### 【0061】

検討した全対象1940例（男性1107例、女性833例）の背景データを図5に示す。男性では、年齢、BMI、高尿酸血症の頻度、血清クレアチニン濃度および収縮期・拡張期血圧が対照に比較し高血圧例で有意に高く、喫煙の頻度が対照に比較し高血圧例で有意に低かった。女性では、年齢、BMI、高コレステロール血症と高尿酸血症の頻度および収縮期・拡張期血圧が対照に比較し高血圧例で有意に高かった。

#### 【0062】

男性19多型、女性18多型と高血圧との関連解析において、年齢、BMI、および喫煙、糖尿病、高コレステロール血症、高尿酸血症の頻度を補正した多項ロジスティック回帰分析により男女それぞれ4個の多型が高血圧罹患と有意な関連を示した(dominant または recessive 遺伝モデルのいずれかが $P<0.05$ ) (図6)。これらの多型の遺伝子型分布を（図7）に示す。

#### 【0063】

本発明者らは多項ロジスティック回帰分析のstepwise forward selection method を行った(図8)。本法では、図6に示したそれぞれの多型の高血圧との関連におけるP値（より低いP値）に基づいてdominant（優性）またはrecessive（劣性）遺伝モデルを採用した。これらの遺伝子の染色体上の遺伝子座を（図8）に示す。

#### 【0064】

Tumor necrosis factor- $\alpha$  遺伝子の-850C $\rightarrow$ Tと-238G $\rightarrow$ A多型は連鎖不平衡になかった[pairwise linkage disequilibrium coefficient,  $D'$  ( $D/D_{\max}$ ), of -0.310, standardized linkage disequilibrium coefficient,  $r$ , of -0.020;  $P = 0.613$ , chi-square test]. Stepwise forward selection methodにより算出した組み合わせ遺伝子型による高血圧罹患のオッズ比を、男性は図9と図11(A)に、女性は図10と図11(B)に示す。男性では4個の多型の組み合わせ遺伝子型(GPIa(1648A $\rightarrow$ G)多型、CCR2(190G $\rightarrow$ A)多型、ApoC-III(1100C $\rightarrow$ T)多型、GP $\beta$ 3(25C $\rightarrow$ T)多型)により、最大のオッズ比が5.34となった(図9、図11(A))。女性では4個の多型の組み合わせ遺伝子型(TNF $\alpha$ (-850C $\rightarrow$ T)多型、TNF $\alpha$ (-238G $\rightarrow$ A)多型、IRS-1(3494G $\rightarrow$ A)多型、GPIb $\alpha$ (1018C $\rightarrow$ T)多型)により、最大のオッズ比が46.86となった(図10、図11(B))。

#### 【0065】

以上のように、多項ロジスティック回帰分析により男性で4個、女性で4個の一塩基多型が高血圧と関連した。即ち、本発明者らは男性で19個、女性で18個の一塩基多型と高血圧との関連について1940例の大規模関連解析を行い、男女それぞれに高血圧罹患と関連する多型を4個ずつ同定した。さらに、多項ロジスティック回帰分析のstepwise forward selection methodにより男性では最大オッズ比5.34、女性では最大オッズ比46.86を呈する組み合わせ遺伝子型を用いた高血圧の遺伝子リスク診断法を開発した。

#### 【0066】

血圧は、血管の構造や緊張性および体液の量と組成を調節する多様な生物システムの統合のみならず、これらのシステムの継続的に変化する生理的必要性に対する適応によって調節される(Lalouel J-M, Rohrwasser A. Development of genetic hypotheses in essential hypertension. J Hum Genet. 2001;46:299-306.)。本発明者らは血管生物学、血小板・白血球生物学、線溶系、脂質・糖・その他の代謝因子などの包括的視点に基づいて男性19個、女性18個の一塩基多型と高血圧との関連について検討した。実際、高血圧と関連した遺伝子群はその病態において多彩な役割を有していた。すなわち、血管生物学(G-protein $\beta$ 3 subunit)、血管の炎症(tumor necrosis factor- $\alpha$ )、単球・リンパ球生物学(chem

okine receptor 2)、血小板機能 (glycoprotein Ia and glycoprotein Ib  $\alpha$ )、脂質代謝 (apolipoproteins C-III)、インスリン・グルコース代謝 (insulin receptor substrate-1) などである。本発明者らの開発した遺伝子リスク診断システムは高血圧罹患の最大オッズ比が男性で5.34、女性で46.86を呈し、とりわけ女性においては、今までに報告された大規模関連解析の中で最大のオッズ比を示した。高血圧と関連した8個の多型の中で、腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の-850C→Tと-238G→A多型が女性の高血圧リスクとして最大のオッズ比を示した。腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子座はフランス系カナダ人において肥満に伴う高血圧と関連することが報告された (Pausova Z, Deslauriers B, Gaudet D, Tremblay J, Kotchen TA, Larochelle P, Cowley AW, Hamet P. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene locus in obesity and obesity-associated hypertension in French Canadians. Hypertension. 2000;36:14-19.)。また腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子の-308A→G多型は統計的有意差はないが本態性高血圧と関連する傾向が認められた (Frossard PM, Gupta A, Pravica V, Perry C, Hutchinson IV, Lukic ML. A study of five human cytokine genes in human essential hypertension. Mol Immunol. 2002;38:969-976.)。カナダ原住民においては、血清腫瘍壊死因子  $\alpha$  濃度は収縮期血圧とインスリン抵抗性に関連することが報告された (Zinman B, Hanley AJG, Harris SB, Kwan J, Fantus IG. Circulating tumor necrosis factor- $\alpha$  concentrations in a native Canadian population with high rates of type 2 diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab. 1999;84:272-278.)。腫瘍壊死因子  $\alpha$  はさらに強力な血管収縮物質であるエンドセリン-1の産生を促進し (Kahaleh MB, Fan PS. Effect of cytokines on the production of endothelin by endothelial cells. Clin Exp Rheumatol. 1997;15:163-167.)、血清中の両物質の濃度は正の相関を有することが肥満例で示された (Winkler G, Lakatos P, Salmon F, Nagy Z, Speer G, Kovacs M, Harmos G, Dworak O, Cseh K. Elevated serum TNF- $\alpha$  level as a link between endothelial dysfunction and insulin resistance in normotensive obese patients. Diabetes Med. 1999;16:207-211.)。これらの知見および本発明者らの上記結果から、腫瘍壊死因子  $\alpha$  遺伝子は高血圧感受性遺伝子座の候補である。他の6個の多型の中で、G-タンパク質  $\beta$  3 $\alpha$



βユニット遺伝子の825C→T多型は高血圧と関連することが報告されている (Siffert W, Roszkop D, Siffert G, Busch S, Moritz A, Erbel R, Sharma AM, Ritz E, Wichmann H-E, Jakobs KH, Horsthemke B. Association of a human G-protein β3 subunit variant with hypertension. Nat Genet. 1998;18:45-48.)。またアポリポプロテインC-III遺伝子多型は血圧に関連することが報告されている (Tas S, Abdella NA. Blood pressure, coronary artery disease, and glycaemic control in type 2 diabetes mellitus: relation to apolipoprotein-CIII gene polymorphism. Lancet. 1994;343:1994-1995.)。ケモカイン受容体2遺伝子とインスリン受容体サブストレート1遺伝子は高血圧の病態に関与することが示されている (Bush E, Maeda N, Kuziel WA, Dawson TC, Wilcox JN, DeLeon H, Taylor WR. CC chemokine receptor 2 is required for macrophage infiltration and vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension. Hypertension. 2000;36:360-363.)、Abe H, Yamada N, Kamata K, Kuwaki T, Shimada M, Osuga J, Shionoiri F, Yahagi N, Kadowaki T, Tamemoto H, Ishibashi S, Yazaki Y, Makuuchi M. Hypertension, hypertriglyceridemia, and impaired endothelium-dependent vascular relaxation in mice lacking insulin receptor substrate-1. J Clin Invest. 1998;101:1784-1788.)。さらに、血小板の活性化は本態性高血圧の病態において役割を有することが報告されている (Andrioli G, Ortolani R, Fontana L, Gaino S, Bellavite P, Lechi C, Minuz P, Manzato F, Tridente G, Lechi A. Study of platelet adhesion in patients with uncomplicated hypertension. J Hypertens. 1996;14:1215-1221.)、Dockrell ME, Walker BR, Noon JP, Watt GC, Williams BC, Webb DJ. Platelet aggregation in young men contrasting predisposition to high blood pressure. Am J Hypertens. 1999;12:115-119.)、Berezcki C, Tur S, Nemeth I, Sallai E, Torday C, Nagy E, Haszon I, Papp F. The roles of platelet function, thromboxane, blood lipids, and nitric oxide in hypertension of children and adolescents. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2000;62:293-297.)。グリコプロテインIaとグリコプロテインIbα遺伝子の多型は冠動脈疾患と関連することが報告されているが (Kroll H, Gardemann A, Fechter A, Haberbo

sch W, Santoso S. The impact of the glycoprotein Ia collagen receptor subunit A1648G gene polymorphism on coronary artery disease and acute myocardial infarction. Thromb Haemost. 2000;83:392-396.、Murata M, Matsubara Y, Kawano K, et al. Coronary artery disease and polymorphisms in a receptor mediating shear stress-dependent platelet activation. Circulation. 1997;96:3281-6.)、これらの多型と高血圧との関連は報告されていない。

#### 【0067】

本実施例で検討した多型のいくつかは、その近傍に存在する高血圧発症と真に関連する遺伝子の多型と連鎖不平衡にある可能性がある。しかしながら、著者らの結果は、グリコプロテインIa、ケモカイン受容体2遺伝子、アポリポプロテインC-III遺伝子、G-タンパク質 $\beta$ 3サブユニット遺伝子が日本人男性において、腫瘍壊死因子 $\alpha$ 遺伝子、インスリン受容体サブストレート1遺伝子、グリコプロテインIb $\alpha$ 遺伝子が日本人女性において高血圧感受性遺伝子座であることを示した。さらに、これらの遺伝子多型の組み合わせ遺伝子型は高血圧の遺伝的リスク診断に有用であることも示した。本発明者らの遺伝子診断法は高血圧の一次予防のみならず高血圧が原因で生じる心血管疾患、脳卒中、腎疾患などの予防にも貢献できると考えられる。

#### 【0068】

この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

#### 【0069】

##### 【発明の効果】

本発明によれば高血圧に関連する遺伝子多型が解析され、そして核酸試料の遺伝子型が検出される。この遺伝子型の検出によって得られる多型情報を用いることにより、高精度で予知確率の高い高血圧のリスク診断を行うことができる。したがって、本発明は高血圧の発症リスクを事前に知る有効な手段となり、高血圧の一次予防はもちろんのこと高血圧が原因で生じる心血管疾患、脳卒中、腎疾患などの予防への貢献が期待できる。また、本発明によれば高血圧の診断に有用な

補助的情報が得られ、より適切な治療を可能とし予後の改善などを図ることができる。更に本発明は高血圧の発症メカニズムを解明する上での有効な情報を提供することから、高血圧の予防法の確立にとって極めて重要な一手段ともなる。

【0070】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> NAGOYA INDUSTRIAL SCIENCE RESEARCH INSTITUTE  
GIFU INTERNATIONAL INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY

<120> Method for diagnosing a risk of hypertension

<130> C02007

<140>

<141>

<160> 36

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5373

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gaattcctgc aaaccagcg caactacggt ccccgggtca gaccaggat ggggccagaa 60  
cggacagggg ccgcgccgct gccgctgctg ctggtgttag cgctcagtca aggcatTTTA 120  
aattgttgtt tggcctacaa tgttggtctc ccagaagcaa aaatattttc cggtccttca 180  
agtgaacagt ttgggtatgc agtgcagcag ttataaatc caaaaggcaa ctggttactg 240  
gttggttcac cctggagtgg ctttcctgag aaccgaatgg gagatgtgta taaatgtcct 300  
gttgacctat ccaactgccac atgtgaaaaa ctaaatttgc aaacttcaac aagcattcca 360  
aatgttactg agatgaaaac caacatgagc ctcggcttga tctcaccag gaacatggga 420  
actggagggtt ttctcacatg tggctcctctg tgggcacagc aatgtgggaa tcagtattac 480  
acaacgggtg tgtgttctga catcagtcct gattttcagc tctcagccag cttctcacct 540

gcaactcagc cctgcccttc cctcatagat gttgtggttg tgttgatga atcaaatagt 600  
atttatacctt gggatgcagt aaagaatttt ttggaaaaat ttgtacaagg ccttgatata 660  
ggccccacaa agacacaggt ggggttaatt cagtatgcca ataatccaag agttgtgttt 720  
aacttgaaca catataaaac caaagaagaa atgattgtag caacatccca gacatcccaa 780  
tatggtgggg acctcacaaa cacattcgga gcaattcaat atgcaagaaa atatgcctat 840  
tcagcagctt ctggtgggcg acgaagtgc acgaaagtaa tggtagttgt aactgacggg 900  
gaatcacatg atggttcaat gttgaaagct gtgattgatc aatgcaacca tgacaatata 960  
ctgaggtttg gcatagcagt tcttgggtac ttaaacagaa acgcccttga tactaaaaat 1020  
ttaataaaag aaataaaagc gatcgctagt attccaacag aaagatactt tttcaatgtg 1080  
tctgatgaag cagctctact agaaaaggct gggacattag gagaacaaat tttcagcatt 1140  
gaaggtactg ttcaaggagg agacaacttt cagatggaaa tgtcacaagt gggattcagt 1200  
gcagattact cttctcaaaa tgatattctg atgctgggtg cagtgggagc ttttggctgg 1260  
agtgggacca ttgtccagaa gacatctcat ggccatttga tctttcctaa acaagccttt 1320  
gaccaaattc tgcaggacag aaatcacagt tcatatttag gttactctgt ggctgcaatt 1380  
tctactggag aaagcactca ctttgttgct ggtgctcctc gggcaaatta taccggccag 1440  
atagtgtat atagtgtgaa tgagaatggc aatatcacgg ttattcaggc tcaccgaggt 1500  
gaccagattg gctcctattt tggtagtgtg ctgtgttcag ttgatgtgga taaagacacc 1560  
attacagacg tgctcttggg aggtgcacca atgtacatga gtgacctaaa gaaagaggaa 1620  
ggaagagtct acctgtttac tatcaaaaag ggcattttgg gtcagacca atttcttgaa 1680  
ggccccgagg gcattgaaaa cactcgattt ggttcagcaa ttgcagctct ttcagacatc 1740  
aacatggatg gctttaatga tgtgattgtt ggttcaccac tagaaaatca gaattctgga 1800  
gctgtataca tttacaatgg tcatcagggc actatccgca caaagtattc ccagaaaatc 1860  
ttgggatccg atggagcctt taggagccat ctccagtact ttgggaggtc cttggatggc 1920  
tatggagatt taaatgggga ttccatcacc gatgtgtcta ttggtgcctt tggacaagtg 1980  
gttcaactct ggtcaciaag tattgctgat gtagctatag aagcttcatt cacaccagaa 2040  
aaaatcactt tggtaacaa gaatgctcag ataattctca aactctgctt cagtgcaaag 2100  
ttcagacctt ctaagcaaaa caatcaagtg gccattgtat ataacatcac acttgatgca 2160  
gatggatttt catccagagt aacctccagg gggttattta aagaaaacaa tgaaagggtc 2220  
ctgcagaaga atatggtagt aaatcaagca cagagttgcc ccgagcacat catttatata 2280

caggagccct ctgatgttgt caactctttg gatttgcgtg tggacatcag tctggaaaac 2340  
cctggcacta gccctgccct tgaagcctat tctgagactg ccaaggtctt cagtattcct 2400  
ttccacaaag actgtggtga ggatggactt tgcatttctg atctagtcct agatgtccga 2460  
caaataccag ctgctcaaga acaacccttt attgtcagca accaaaacaa aagggttaaca 2520  
ttttcagtaa cactgaaaaa taaaaggga agtgcataca aacttggaat tgttgttgat 2580  
ttttcagaaa acttgttttt tgcattcatt tccctaccgg ttgatgggac agaagtaaca 2640  
tgccaggtgg ctgcatctca gaagtctgtt gcctgcgatg taggctaccc tgctttaaag 2700  
agagaacaac aggtgacttt tactattaac tttgacttca atcttcaaaa ctttcagaat 2760  
caggcgtctc tcagtttcca agccttaagt gaaagccaag aagaaaacaa ggctgataat 2820  
ttggtcaacc tcaaaattcc tctcctgtat gatgctgaaa ttcacttaac aagatctacc 2880  
aacataaatt tttatgaaat ctcttcggat gggaatgttc cttcaatcgt gcacagtttt 2940  
gaagatgttg gtccaaaatt catcttctcc ctgaaggtaa caacaggaag tgttccagta 3000  
agcatggcaa ctgtaatcat ccacatccct cagtatacca aagaaaagaa cccactgatg 3060  
tacctaactg gggtgcaaac agacaaggct ggtgacatca gttgtaatgc agatatcaat 3120  
ccactgaaaa taggacaaac atcttcttct gtatctttca aaagtgaaaa tttcaggcac 3180  
accaaagaat tgaactgcag aactgcttcc tgtagtaatg ttacctgctg gttgaaagac 3240  
gttcacatga aaggagaata ctttgttaat gtgactacca gaatttgga cgggactttc 3300  
gcatcatcaa cgttccagac agtacagcta acggcagctg cagaaatcaa cacctataac 3360  
cctgagatat atgtgattga agataacact gttacgattc ccctgatgat aatgaaacct 3420  
gatgagaaag ccgaagtacc aacaggagtt ataataggaa gtataattgc tggaatcctt 3480  
ttgctgttag ctctggttgc aattttatgg aagctcggct tcttcaaaag aaaatatgaa 3540  
aagatgacca aaaatccaga tgagattgat gagaccacag agctcagtag ctgaaccagc 3600  
agacctacct gcagtgggaa ccggcagcat cccagccagg gtttgctgtt tgcgtgcatg 3660  
gatttctttt taaatcccat atttttttta tcatgtcgta ggtaaaactaa cctgggtattt 3720  
taagagaaaa ctgcaggtca gtttggtatga agaaattgtg ggggggtgggg gaggtgcggg 3780  
gggcaggtag ggaaataata gggaaaatac ctattttata tgatggggga aaaaaagtaa 3840  
tctttaaact ggctggccca gagtttcat tctaatttgc attgtgtcag aaacatgaaa 3900  
tgcttccaag catgacaact tttaaagaaa aatatgatac tctcagattt taagggggaa 3960  
aactgttctc tttaaaatat ttgtctttta acagcaacta cagaagtgga agtgcttgat 4020

atgtaagtac ttccacttgt gtatatTTTA atgaatatTg atgttaacaa gaggggaaaa 4080  
caaaacacag gTTTTTcaa tTtatgctgc tcatccaaag ttgccacaga tgatacttcc 4140  
aagtgataat tttatTTtata aactaggtaa aatttgTtgt tggttccttt tataccacgg 4200  
ctgccccttc cacaccccat cttgctctaa tgatcaaaac atgcttgaat aactgagctt 4260  
agagtatacc tcctatatgt ccatttaagt taggagaggg ggcgatatag agactaaggc 4320  
acaaaatTTt gTTTaaaact cagaatataa catttatgta aaatcccatc tgctagaagc 4380  
ccatcctgtg ccagaggaag gaaaaggagg aaatttcctt tctctTTtag gaggcacaac 4440  
agttctcttc taggatttgt ttggctgact ggcagtaacc tagtgaattt ttgaaagatg 4500  
agtaatttct ttggcaacct tcctcctccc ttactgaacc actctccac ctcctggTgg 4560  
taccattatt atagaagccc tctacagcct gactttctct ccagcggTcc aaagttatcc 4620  
cctcctttac ccctcatcca aagtTccac tccttcagga cagctgctgt gcattagata 4680  
ttagggggga aagtcactctg tTTaatTTac acacttgcat gaattactgt atataaactc 4740  
cttaacttca gggagctatt ttcatTTtagt gctaaacaag taagaaaaat aagctagagt 4800  
gaatttctaa atgttggaat gttatgggat gtaaacaatg taaagtaaaa cactctcagg 4860  
atttcaccag aagttacaga tgaggcactg gaaaccacca ccaaattage aggtgcacct 4920  
tctgtggctg tcttgTTtct gaagtacttt ttcttccaca agagtgaatt tgacctaggc 4980  
aagtttgTtc aaaaggtaga tcctgagatg atttggtcag attgggataa ggcccagcaa 5040  
tctgcatttt aacaagcacc ccagtcacta ggatgcagat ggaccacact ttgagaaaca 5100  
ccacccattt ctactTTttg caccttattt tctctgttcc tgagcccca cattctctag 5160  
gagaaactta gattaaaatt cacagacact acatatctaa agctttgaca agtccttgac 5220  
ctctataaac ttcagagtcc tcattataaa atgggaagac tgagctggag ttcagcagtg 5280  
atgctTTtTa gTTTtaaag tctatgatct gatctggact tcctataata caaacacaca 5340  
atcctccaag aatttgactt ggaaaaggaa ttc 5373

<210> 2

<211> 50000

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

aagcttcagt atgcaaattt tcaatgacat gtgcctgtgg attctgaaaa ttcacagatc 60  
tgtctatcct tagctgagac tgaaggcatc tacttcccaa tgaccaaadc ctggtgctgt 120  
ggcgacactg agcaggaact ccattagaat atcaatatca ctctgcagac attccatgat 180  
gtaagctatg ttttctcttg ttgcaattac acttaattta ccaccagctg cttcaatgtc 240  
atgggctatc ttgaaaaatg aagctccttt cgtagtcaaa ctggatgcaa gacacagcaa 300  
atgagaagtt actaaattgt tggagtcctc atagctactg cctgctttta tgaacaaacc 360  
aattcttgat gcagggcata gttttccaaa ggagaaatca taaaaccatt tggaaatttg 420  
atgatctcaa ggtcctgatg atgtggagcc actcctatgg gggtagctgt ggctttaact 480  
ttgggggcaa ctttgaggga ataaagtctc aaaaagaggg aataaagtct caagattgtt 540  
cgtgacccat agtaacttct ggcttaaagg accattcggc aagtttttaa atgtattttc 600  
tataatttcc atgtagtctt ttatatattc tatttcttat ttaaaacctc tattttagct 660  
cgtttccttt gacactgctc tggcagggaagg ggggtggca ctgcctcatt actgccaggt 720  
aggggtagaa gtccattatc cacttggtct ccattgatac ccaaagtggg gagaggctcc 780  
tgttactgct ggtgagggtg ggagtcccc cactaagttt ctgctaatac tgccttggtg 840  
gcttgctact attcccatga agcctccact gatactacat tacttttggg tgggtggcaa 900  
tgtcctgcct ctccactagc cctcctgctc taaaacaacc cgagtaggga gtgggaagga 960  
agctttgtta ctggtaggtg ggagctgaag tccagacttg ccacattgtc ccactgatgc 1020  
tacagggagg aggaagcggg ccacattact gcctgatagg gatgaaagcc ccagctccct 1080  
acctggcctt cgctgatacc agcctgctac aggagtgaag agagatttga aggcctcaat 1140  
atagcctgtc gaggggtggaa gtcttgctcc caatgggcct ttagcagcat ggggtgggtgt 1200  
ggggccatag ctgtctctgt actgcttggc tagagtggag tatttgaggt ccaaagttt 1260  
tctgtctttc tagccctttg gttagaaaga gcagactttt gttggaagta ttttttgtg 1320  
ttacctgtt gtatttccag gttcctagct tctccagcac agtctgggat gtgtgagaca 1380  
cagagaaaat ccagtgatgt tactaccgta tggtttcttg ggtcccaacg tctctagcta 1440  
atctgtcca ctttttgag ttttcttatt tgttttagat cagggtattt gtcattttt 1500  
ataggagaaa tatggaaaaa tacttctact ctatcttctt ggaagttcct gtttattttt 1560  
tatgtccttt tctctggct agaccgtaag agacttacga acaaacact tacacattct 1620  
actaaactca atgtccaaag tttgtgaact tcttgaatat tgcttgttca tttccacccc 1680  
cagtcactga ctgaatctcc ctgctgtctg tctacaatgc caatgagctt ctggttaact 1740

tcttctcatg catgcttagg caacaacttc ccagttttac tacacttgcc catccctagt 1800  
tttgttgttg cttaatccct tggccttagtg ccaccatact cctccagcag agcaaccaat 1860  
tcttacatta taggacagca catatccact aaaaacagtt catgccacac caaccacatt 1920  
tccctttgtc aacaaaatta cttgatagat aattccagga atgcctgatg aagctgattg 1980  
acaacaagat atttggcaga ctctctgctg cctatacata ccttagcatg tggaactcaa 2040  
gtaatgagag gtccatttaa ttggattgaa ttgggctgga taggattgga ttgaatcctg 2100  
tgggatggct aggctaaatt agaaatgaag actagtittaa cagcagtatc caaggatagt 2160  
tgactaatga gttaatttta ctctcaaaga cagtcttttag tagtaagctg taatgcatta 2220  
tatcaaacta ttttccagtc aatgatttat aagttacttg aataaggatg cttaaagatgt 2280  
gccttattga aatggcaatt agcacaaagt tgggaatgaa atctaattag ttaaataaca 2340  
gaatcacata aaaaaggact tgaataaatg tagcatccta ccatgttcct ggatagaaag 2400  
actgctatcg taaagatatt cattctctc aggttaaatt ataaactcaa tgcaattcaa 2460  
caggatttta aaaaactaga caaagtgatt ccaagtttac gfggaaaata aaatgtgagg 2520  
gaccaaaca tatttgaata agaaagagaa taaaatctca tccttccaga taccacaatg 2580  
tattataaag caatagtaat taacatgagg gcagaaatga gcaagcaagt gaacaaaata 2640  
agacagatag tcacaggaaa ctcatatatt tatagggtgct ttgcgtataa tgaagatggg 2700  
ccttcaaate agttgggaaa agatgggtta ttcaataaat ggtgttgggt aaaattgggt 2760  
atacattggg gagaaataaa gtgaaactcc tactttgtat catatgcaa aaatagattc 2820  
cagacagatg aaatatitaa atgtaaaaaa taaaattcta aaactactag aaaaaaaga 2880  
agaatatit ttttctttg aaatagaaaa ggtcttacta agcaaaacac agaagtaata 2940  
aatgaataaa tgaagacaaa tatgataaaa ataagttaaa aatataagca atctttcttt 3000  
gttttttttt cacctttcct agaaaaaaat atataggcaa cttgttaagc aaggtagatt 3060  
acaagaaaat atttacaaca tttagacaggc cacagattat tatccagcct catctgataa 3120  
gaaaacttca acataaagat atctgttttt tttcttataa ggttcctcaa agtgagccaa 3180  
tcacttctta agctgaacaa aaaacaaaac agaagtgatc tttccaata atgaaaacaa 3240  
acattgacag agcagctgta ggatcccttc aggcaaatta tgaaaagggt ccctttctca 3300  
gaaaccacag ttaccattca gctttgtgac cagaggtttg actgtaccct agtcctact 3360  
agcaacccaa ccacataacc aacttcaaag gtcctgaatg actgtgttgt acttaatggc 3420  
agatgatcta tctcccattt ttgtcctaag gattttccaa gataatatat ttctgcattt 3480



gttttgcttt tacttcactc caaattgaaa tctatttgtg ggataagact aaagaaatgc 3540  
ttataggaaa attgatagca ccaaattcct atcttaaaaa atgaaaaagg tttcaaatca 3600  
atgacctcag cttttacttt aagaaaatag aaaaagcagg ataagctaaa gccaaagtaa 3660  
acagaagaaa ggaaattata aagataagag cagaaatcaa tgaatagaaa acaaaagaaa 3720  
aaaatcaaac caaacagctg attctttaag cagatctata aaattgataa aactctagcc 3780  
agattgatca agtaaaaaag agagaagaca caaattacca gtattaagaa tgagagaggc 3840  
aatatcacta cagatcctac agatataaaa agtataaggg catactttga ataattttat 3900  
gactataaat taggcaactt agataaaaca aatttcttga aagacacaaa caaccaaaagc 3960  
tcacctaaaa tactcacaaa ttgaatagtc ttatagctat tacaaaattg aggccaggcg 4020  
cagtggctca agcctttaat cccagcactt tgggaggggc aggaaggcgg atcacgaggt 4080  
caggagtittg agaccagcct gactaacatg gtgaaaccct gtcttacta aaagtacaaa 4140  
aattagccag gcttggtggt gcgtgcctgt aatcccatct actcaggaga ctgaggcagg 4200  
agaattgctt gaacctggga ggcaaagttg tggtaggccg agatcgcgcc actgcacttc 4260  
agcctgggca acagaacaag actccgtctc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaattgaaat 4320  
tatagttaaa agtcttccca caaagcaaac tctagacca gatggcttca atggtaaatt 4380  
ctactggaca atcaaacagg aaacagtaat aattctccac aatgtctttc ataaaattga 4440  
tgcggaggag atactctcca actcattcta tgaaactagc attaccctga taccaaaatc 4500  
atacagagac agtgtaggaa aacaacagat cagtatcctt catgaacata aatgaagtac 4560  
aatgcagtct tatgcataaa tcagagcttc attgttctac agataaggta atgtaggatt 4620  
gttggttgcc cctccaggtc tgttaaattc acctccttc ccagagagca tccttcttaa 4680  
ggacaggagg cctcaatatg tcagtcctca cagcacctcc ctcagtcttc agcacttacc 4740  
agctcatcac cacaaccgat accacattgg ataatttcat gaattacttt agagcaaatg 4800  
caagagaaaa aatggatttt tatataggag aagaaggagg aaattcttgt ggatttggtg 4860  
cagaataggg ccaagggaaa attacagatg taaaaagaaa agtgtgtgaa atagtatcct 4920  
tagtgctcac aaatacaatg atttcattgt ttttaaaaat aaaaaatgac aatgtcttaa 4980  
tgcttggtgg taatgcttta ttgaatgtgt gttatacact ggcttctcat tcctgaagtt 5040  
agaaataata ccttctctt ttcatttggt tatgtttgct gaaacaaatc aaaggctgag 5100  
attgaaacac atgctacttc aggtggatga cttactact aagctcatca caacagcact 5160  
tacagctgaa gacccagag tcctacctaa cttttgtcac aaccagatt ttggccatgt 5220

agttctgggc cttaccatta aagcagacag aagtcagagg aatgactcct ttccacttga 5280  
agtgaactgc aggcttctag gaaaggcaag atgcacattt ccctcctgtg gagcataaag 5340  
ccttttgaat tcaggactta ggaccatat ggatttgaaa tattatgaca ttggagctgg 5400  
agtggttggg gacaacacca gtagtggtat aggccatgga atgtcaaaag aacatggaac 5460  
cctgttaaaa tcattaaaca tcaaaactct ccctcctctt ggtgatatgg tttggctgtg 5520  
tccccatcca aatctcatct tgaactccca tgtgtgtgtg gaggcaccca gtgggaggta 5580  
attgaatcat gggggcaggt ctttcccatg ctgttttcac gatactgaat aagtctcaca 5640  
agatctgatg gttttataaa ggggagcttc cctgcacaag ctctcttctc ttgtctgcca 5700  
ccatgtgaga catgcctttc acctccgcc atgattgtga ggcctcccca accatgtgga 5760  
acttttaagt tcattaaacc tcttctttt gtaaattgct cagtctcaa tatgtcttta 5820  
tcagcaacgt gaaaacagac tatctgattt tctgtgggat gtggattatg accatggaca 5880  
gagcataact gggacagagc tggaaaaaat attaattagg tgcttaaaaa tatttggttag 5940  
aactatcttc atgaatgaga atcaatcctg tttccatggt gattcaccag gcatcaattc 6000  
caagcatcca tgaatcagaa aagtcctatc ttctcttagt tatcatccag gactccaagg 6060  
aaccataatt agccaacctg ttcacatttc cttttcattc actagcctcg aagtttccag 6120  
gggacaggga ctctgtccta ttcatttctg taaccttacc acctgacca gaatagctgt 6180  
tccctgaaga tttgggtgat tataaatgtg gatgtcttat ttctttgaaa gtgtgagctt 6240  
caggtactga tcacgttatt ccaattatca atttagtata tttcttcacc attaaactgt 6300  
gaaattcttg agggaagaac ctatgactga tttatctctg taaactcatg ccaccagtat 6360  
tcaaaatcac acctagcaca tagtaaacac tcaatgtttg ttgaatgact gaaggaatgg 6420  
atgaaaatga acctccttgc ttctgaccag tggatgagtt gcttggccgt gttcctacag 6480  
cctagagctc atcccctaaa gcatctgaag ttaccatta gtgcaatggt tcttgaacgc 6540  
tggtgttgat cagaatcatc tggatgccca gggtctctga aataagatag ggtctaggca 6600  
tttgtatfff taccaaggag gtgtgatgga gtcagatgca agaaggctag ttgaagaaac 6660  
cacatgagag tttagtgtag tgtattagaa gactggtttg gctctgtcgc tagtggctac 6720  
atcatcttgc tcaagtcatg ccagtctcag gacctattc agtctcttca gctgtaatat 6780  
gggtgggttg caccacataa ccagaaagat ccctccagc tctaccact tacaacatgg 6840  
tcaaatitgg tctgattttt taaatcgtag tacaatatat atgacataaa attcaccatt 6900  
ttagccactt taaatgtaca attctgtagc attaaactaca ttcacattgt tgtgcaacca 6960

tcactaccgt ctacttccag aactcttcat ctigcaaaac tgaacctctg ttgtcattag 7020  
tcactaacta ttctctccc cccctccttc taggccttg caatcaccat tctactttct 7080  
gtcgctatga atttgactac tctaggtaac ttatataagt ggaatcacag catttgccct 7140  
attatgactg gtttagttga cttagcaca cctcctaagg ctcaaccaca ttttagcatg 7200  
tgtcagaatt ttctttgttt ttaaggctga ataatttct gttgtatctg taaataacat 7260  
ctttattcat ttgtccatca acagactgtt gagttcctcc catcttttga ctattgtgaa 7320  
aatgctgct atgaacctga gtgtacagac atctggttga gtactgcttt caattcattg 7380  
tttatatgga tcatatggta attttatgtt taattttttt ggaactgcta cattgttttc 7440  
cacagtgtac atcattttac atttccatca gcaatgcaca aaggttccaa tttctccaca 7500  
ttcttaccaa cattttttat tttctgtttc ttatttattt gtttatttat tctgagacag 7560  
agtctcactc tgtcacctag gctggagtgc agcagggtga tctcagctca ctgcaacctc 7620  
tgccctcccat gttcaagtga ttctcctccc tcagcctccc aagtaaatgg aattacaggt 7680  
gcccaccacc acgcccaggt aatttttgca ttttttttag tagtgatgag gtttcacat 7740  
gttggtcagg ctggtcttga actcctgacc tcaagtgatc caccgcctc agcctcccaa 7800  
agtgtggtga ttacaggtat gaaccactgc acccaggcca ttttttgctt tttagataat 7860  
agtcactcta gtgggtatga agtggtattt cattgtggtt ttgatttata tttccctaatt 7920  
gatcagtgat attgagcatc tticaagtgc ttattggcca tttcttctt tggagaaatg 7980  
tctatgcaag tcctttgctc attttttaatt ccagttgctt tttgttattc tttttgattt 8040  
gaaagtgtc tttatactc ttgtatacta atcccttacc agatatgatt tataaatatt 8100  
ttcttctttt ccatggattg ccctttttac tctgttgata gtgttctttg atacaaaata 8160  
atttttaatt tgaatgaagc ccaattaatc tatttttggt tcttttggtg cctgtgcttt 8220  
tggtgtccta tccaagaaac tgttgccaaa tccaatgtca taaagctttt tcccatgctt 8280  
ccttctaaga gttttgtagt tacagctctt gtatttaggt atttgactat tttgagttaa 8340  
tttttgtaca tcgtataaaa taagaatcca atttttattt tattttactt tttgtatgtg 8400  
gatatccaat ttccccacca ccattcattg aaaagactgt ccttttcta tcgaatggtc 8460  
ttggcaccct tgtaaaacat aatttgacca tatatgtgag ggtttatttc tgggctctct 8520  
attctattct attctattct attctattct attctattct attctattct attctattct 8580  
attggtccct atgtctttct ttattctagt accaccattt tgctcatcat aactttgtag 8640  
taagttttga agtcaggaat cgtaagacct ccagctttgt tcattttcaa gggtgttttg 8700

attattcaag gtccttigat agtccatatg aatttcagga tggatttttc tattttctgca 8760  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaatcatt gaaattttta aacagattgc attaaatctg 8820  
tagattgttt tgggtagtat tgacatttaa caacattaaa tcttccaatc aatgaactag 8880  
gctattttta tttatttttt ctgtttcttt gagctacttt tgtagttttc agtgtataag 8940  
tttttgctac ctggttaggt atacttctaa gtattttcta ctttttgatg ctattgcaca 9000  
ttgaatcgtt ttcttaattt ggtggtagcg gggattgtgc attgttagta cataaaaatg 9060  
caactcattt tttgtgtgtt gattttgtat cctgcagctt taacaaattc atgttagttc 9120  
taacagactt attctatgaa tcattaggggt tttctacata aaagatcatg tcacctacaa 9180  
acagagataa ttttactcca ccccttcccg ttgcaatgcc ttttatgtct ttttcttgcc 9240  
taattgttct ggctaagact tccactacca tgttgaatag aagtggtgaa agtagacatc 9300  
cttgtcttgt tccaatctta gagccaaagc tttcagtctt tcacggcctg aaagactttg 9360  
taatatgttc tcaaggttaa agaacttcag aagttttcta agcaagagac cattttatta 9420  
acttagttgg cagcaattct gagagattag aatgaaaaga tagaggataa gaagtatctg 9480  
gcaggtataa tatattgagt gtgctgaata tacttttagt tttgtatagg tgttaaaaaa 9540  
tggcaaagga ggccgggcgt ggtggctcac gcctgtaatc ccagcacttt gggaggccga 9600  
ggcgggcaga tcatgaggtc aggagatcga gaccatcctg gctaaaacag tgaaacccta 9660  
tctctactaa aaatacaaaa aactcgctgg gcatgggtgg ggacacctgt agtcccagct 9720  
actcgggagg ctgaggcagg agaatgggtgt gaacctggaa ggtggagctt gcagtgagcc 9780  
gagatcacgc cactgcactc cagcctgggc gacagagaga gactccgtct caaaagaaaa 9840  
aaaaaatggc aaaggaaaga atgaaaaata aagcaaggtc ccagaagagg ccaaaaatct 9900  
taatcaaat tgactgaaca ttacggaatg aaatggtttt tcctttactc caattaacga 9960  
cttcacaaga agattccatc ctcgtttata agattaaccc aaaaccagca cttaaaacca 10020  
gaagccttga aaggatggag tttggggacc cttctcatgt ctattcccag aaggggggtct 10080  
tcttctgggg tctgtcccc taaagagcta ggcaaaaagt atgcttgcca catctgttga 10140  
aagatagaaa gttggtctaa aaatacatga gagggaactg aaacatttca gagaaggcaa 10200  
gactcagaag taagaaacca aaagaggaag gtaaaattct agttacaaag aaaagaggaa 10260  
tggaatttaa attgtcttac agagaaaatc cagaactgcc ccctcttccc ttactactcc 10320  
atcaaaaaag gggaaaaata gtcaatggga aagttttgag aaaaatagat ctctgcattc 10380  
ttctgggtga gaattcagac aacttgaact agagagctgg gtaatttctt gactaaaggt 10440

gtgttagatc tgaaagggtt tttcttaaaa ttgtctgtgt tcatccctcc catcttagag 10500  
aggaacacag gataagagac ctctggagct ccccagggt caccgagcta ataggatcag 10560  
agacaaagct acaaagtcatt tttctgacat ctctccagggt ctcttttttt ctggaccccc 10620  
catatcaaca tgatgtatctt attacattgg attagcaact ctcttgagc tttctcagt 10680  
accaggttta catctcagtc tgtgggtctc agagaaagta cccaatcagc agcaacatta 10740  
cctggaaact catcagaagt gcccctcctc agccccaccc cagatctatg caatcagaaa 10800  
ctctggaaat gcaggccagt cctaacaagc ccaccaggga attctgggtgc actaaggttt 10860  
gagatccact gatcaaagaa ataatttcc tttcttcat tataatagca tgaataataa 10920  
ctaactgta tttcacaatt tacaaaagag ctttatgctc ttgttaaatt tgagggtagt 10980  
cttctcaaaa tctctgtgag gctagaaagt cagatattga aacacctgtt ttatgggttc 11040  
aaagataggt tcaaaagaga gtaaattgatt gttgggggtgg cagggtccaga gagggcagga 11100  
tcaaaactgc aattgagtct tctgccttat aaaccagcat agcttcccca aggcacgtca 11160  
cttctcgata aaatgggtgac aactagagtgc tcttttcaga tcattcttag aagcatggag 11220  
tgctaggtca attgtgtaat tgatgaggaa ataataatac taagaactcc catcttctac 11280  
gtccttatat acaatcctgt caggtagaag ctgagtctca gagagaacaa gttgccctcc 11340  
caggaccacc aggttaagctc ggcatagctg tgcttagaat gtaggctgtc tggcttctgg 11400  
gcttgctgc ccaggagggtc tttgtgggtt ctacttggtc atccagatca cagaggggca 11460  
gcactgactc ctaccagtg ctcttgactg tacatctaact actttctact aagaaaaccc 11520  
cttctcttta gaccaatggt tttcaaactc ttggtgtgcat tggaatcacc tggaaagctt 11580  
gttaaaacac agattgtccc accccaagag tttctgattc tgtaggctgg ggtggggacc 11640  
catgaaagtgc catttctaact aagggtccca gtgatgctga tgccaccagt gtgtggacaa 11700  
ccctttgagt ggtgaagctc tggacaccct aatttgcaag gctaactcagg catatgtggc 11760  
aatgaatac gaactgaaat tctgactcca atatcttcac tgatattcct aatccatagc 11820  
atacacacag tccattcgt ttccttttta gcttttaact tacatttatc ctttcttctc 11880  
ctgccactgc cttctctcca gttagctcaa accaggtaac acataaccgc ctcttaactc 11940  
atccgcccag ttggtttctt tggctttaat ctagacttct tatctccacc agatttgcct 12000  
taccaaagca ccaatttctt aaggcagggt tagaattaaa aatcttctgt tctcctcat 12060  
tgcctaaaac tcttaaactt atgattcaag gtcttccatg accttcattg accagtctaa 12120  
cgttttagcc tgtcctaagt gacatgcctc caccacatac ttcatgcttt ccactttctt 12180

tctccatgtc ttgtttcatg catttccatt tcttctacct gcgatgtcct ccttcgccat 12240  
ctctgtagat ttaaaaatcc tacagggtc atctcaaag ccctttcctt catgaagcct 12300  
ttcatgaaat ccccatcgag aggttttccc tctctcage tctccaaagc acagatgtct 12360  
gcgtttgtgg ctattatctt acgttgtttt gtattaaaat ttctccagct ttacacattt 12420  
gtcatcctct taaggacaaa catcttatta tggatcaatgt gaagctatag aggataattt 12480  
aatgaaatat tccaagggt agtcattaca catgactgat ttatctctgt aaactcatcc 12540  
acactcatcc acctgatttt gattggccaa gttaatgaat cagagaggaa aagatggtaa 12600  
aaatataata aaaatctcct aggtagtctc acatcccaca gagccccagg taatgaaatg 12660  
aggccctgag ataatacttt atgaacaata aaactccggg ttctattgac agtgaagcaa 12720  
gacctgagag agaaggctaa attcccttgt gtctagctgc cacaatcttc tgagaataat 12780  
ggcctttcct cccgtctgcc ttctgaatca taggcaaatt tttctctttg gtgatcccta 12840  
atacagaaag gggaagtcaa ataaaatata tacaaggaga aggattctgg gagacagagt 12900  
ttcttgattc ccttctgcat gctcctcctc aaaagccttt atgagcttac cttacattta 12960  
aattctttta aacaaggcat tatgtggtct ggtcttttcc agctccacac accttcacac 13020  
tacattcccc ccagctaatt ctgctctggg aacactgacc ttcttttagt tctttgaaca 13080  
cattgatttc tggatcaagat gactcagtaa cttcaacctt tgttgtgccc ttggtgctgt 13140  
gaagatatag atatatatta accactgcac accagaaatc agaaatagca caacagagaa 13200  
taaagtcatt gagccatctt ctgagctcca aaagacaaat tttctccaaa aagacaaatt 13260  
caggctctaa aacaatacct taaggaacca gaagtggaat agaaaattaa ggtggtaagc 13320  
agggtctaac cacatgcctg ttgagcccag gtttggaga agacaatggc aggtaggaat 13380  
gtggtttctg atgggtaata ggtactgttt tcatttactt tctgttgctt ataacagaat 13440  
atctgaaact ggttgcttta taaagaaaag gaatttatgt cttgcagtta gggaaactga 13500  
gaagtcaaaa gttgagggt gcaattgaca agtgccttct tgctgggtggg gatactctga 13560  
agagtcttga ggtggtatcg ggcataccac tctcagttag gggactgagc atactaggtc 13620  
aggcttttct tctcctttt ataaagctat cagtccact cttatgataa cccattaatc 13680  
cattaactga ttagccaatt aatccatgaa tggattaatt cattcatgag ggcagagcct 13740  
tcttgacca aacacctctt aaagactcca cctctcaata ctgccacatg ggggattaaa 13800  
tttcagcatg agtttttgat gagacaaata ttccaatgat agcagttatt aaaagtacat 13860  
gcttgagaga aggggattgg agtcagctc agtgcttaaa ctcaaaagct aggatgaggc 13920

tctaacactc ctgaaagaag gagttgctgc tggctcctta ccagggtat atcttttaca 13980  
gagcaggaga cctaaagagg caggaggacc cggacatcgt ttggaaacca agcactaaaa 14040  
caggccatct gttatacccc caatatcctc tcaggacaag tgttttgaac cactcacaca 14100  
aggactagtc tgggcaagtg ggctagatga agaaaccaca aaatagctaa gtggggagag 14160  
aaagacaaaa aatactatct tattcaaaat gaaaatacaa tccaaaattc catgattcat 14220  
gaagaaatca aatggtatgt gttaggtggt tcttgcatg ctatagagaa atacctgaga 14280  
ttgggtaatt tataaagaaa agaagtttaa ttggctcata attctgcagg cttcacagga 14340  
agcatggtgc tggcatctgc tcagcttctg gagaggcccc aagaagattt gctcaaggca 14400  
gaaggttaag ggagagctgg cacatcacat ggtgagaaag gaagctagag agagagtgc 14460  
gggtgaggtg ccacaagtta ccacagccag atctcttgag aactcactta ctttcatgag 14520  
gacagcacca agccataagg ttaggggagc caaagtccca tgggacatga ccaactcagc 14580  
attccactgg aggctatatg atcaaacagc aaactgttta tcacgaatgc aggatgtgag 14640  
caaactcaca actggtcctg ccaacagaag gtttgttgga ggcaatcact ccctgggtgcc 14700  
tgaggtaatc tactgcaaca tctagagaat gcagtcctgc aagcctactc tggacagggc 14760  
agctggcacc ttattccatc ccccttctca ctatcttttt ttgcctaata aatacagagg 14820  
gctgtgtaaa gctcagggcc cttgtccact agaggcaagt tgccccctga ccccttcttc 14880  
caaatatact cttttgtctc ttgtctttta ttctcacatt tgcccccttt gttcagttcc 14940  
actaggtccg tgcggttat atactggtgc cctgagcagc aacagaatca ggctctcaac 15000  
aagtgtcatc cgaacatggg actttgagga catgaacgaa gaaggtctgc tggagcagag 15060  
gaacagaaat tgacaagggt aacagggacc ctgggacgag tctgccagca gcggatataa 15120  
ggtcagttac ctaaagaggt actgatcagt gccctaaaga gatactggga gcagtgtttt 15180  
aaagaagtac tgggaatggg aaattttctg aatcagggt acaaggggaa gaatttgtct 15240  
attaaagaaa aacattatgt gcagttgctt aaagttgtat tggaacagtc tggagcttag 15300  
gttaatttgc agacactaac tatcacatgc gtccgtgtga agagagtcca ccaacaggct 15360  
ttgtgtgggc aataaagctt tttaatcacc ttggtgcagg tgggctgagt ccaaaaaagg 15420  
agtcagcaaa gggagataga ggtggggcag ttttatagga tttgggtagg tagtggaag 15480  
ttacagttaa aagtggttat ctcttgtggg cagaggcagg ggtcacaagg tgctgggtgg 15540  
ggaaatcatg agactctttt tctgggacag gagtgcaca aggtcaattg atcagttggg 15600  
gtggggcagg aacaaatcgc aatggtggaa tgtcatcact taaggcagga actgactatt 15660

tcacttcttt tgtggttctt cagttgtttc gggccatctg gatgtatagt gcagctcaca 15720  
ggggatatga tggcttaggt tgggctcaga gacctgacat tcctatcttt ttatattaat 15780  
aagaaaaaca aaacaaaata gtggttaagt gttggggcag caaaaatttt ttggggtggt 15840  
atgtagagat aaggggcaat gtttctcagg gctgcttcaa gcacgatcac ggtggtgtgg 15900  
gaatctagag tgggagagat taagctgaag aaaaattttg gggaaagggg tgatattctg 15960  
gggttgtagg aaggagcatt tgtcatatag aatgatgatg gcctggatgt ggttttgtat 16020  
gaattgagaa actaaacgga agacacaagg tccaaataag agaaggagaa aaacaggcat 16080  
taaaggatta agaattggga ggacacagga catccaatta gagagtgcc aagggggtcc 16140  
agtgttaatta ttigcctgga caatgagttt tggggctcta ttaggtgtc atataccagg 16200  
ccagattgat ttaggtaaaa acaacactct tcatttaaaa tatacagagt cctccttttt 16260  
tagcagttag taagttgaga cctattcctg tcttcttata ttaataagta aaataaagca 16320  
aaatagaggt gaagtgttgg tgtcatgagg ggaacaggaa gcagttcggg cctatttgca 16380  
aattgatttt gggggggtaa agaaaactag tgtaccttg cctgtccaat taataagtag 16440  
acacatgtag atggaggagc cacagaggaa gaagagaact ttgtaaggca aaactggaaa 16500  
tgtaaaggga aaagatgaga gggagcacca aaagaggtgt cttgcacca gactcaggga 16560  
tctagttaga gcagcagctg ttagagggtt taatggggat taatggggct actgggtaga 16620  
gggggaggtt caacttttat ggtgtatgag aaagcgcata gtgtctacaa gcaacctttc 16680  
attgctattc ataggattgg gtataagtaa acaagaagg ggggctagga ggagagtctg 16740  
aagaacaagg ggaaggtagc caaggatgga gtgaaatgta gggcaaatgt cttaaaggaa 16800  
atgagaggtt ctaagaggag ggctagtggc ttgtaacca catggaagag gttacgaaag 16860  
gatgatagaa tggaatgagc ctgtgaggct ggaaggagga attttccttg gtccaagaac 16920  
catttgcctt gtgtgggaag agtttgatag gtggaagttt cagtgggagg gtaggcggga 16980  
gtgactgatg agaaggagaa aaactggcca taagggacag aagttggaat gctagctgct 17040  
cctttagcta ccttatcagc ataagctttg ccctgagtga tgggatctga tgccttttga 17100  
tggcgcttgc agtgaatgac ctagcttcc ttggaagtag agcagcttta agaagagttt 17160  
ttatgaagaa ggcattaata atggaggacc ctctgtatagt gaggaaacct ctttcaggcc 17220  
atataacaga atggaggtgg agaatatgga aggcataatt agagtcagta taaatactga 17280  
cacacaatcc ttttgcaaga gtgagggtc gagttaaggc aatgagttcg gcttgctgag 17340  
agggagtgga gtggggcaga gtggtagcct caatgataga tgtgaaagat actatagcgt 17400



agcctgcctt tgctggtgag tggtagtag gcctagtga actgccatca ataaaccaag 17460  
tgtgatcaga gtgaggaaca ggaaagaagg aaatatggga aaatggagtg aatgctaggt 17520  
ggatcagaga gatacagica tggggatcag gtgtggtatc aggaataatg tgggaggcca 17580  
gattgaagtc caggccagga acaatggtaa ttgtgggaga ctcaacaaag agtgagttca 17640  
actgaaggag ccgggggagg gggagagcgg cagaaagtat atgcatcagg tgtgaggaag 17700  
aaaatacatt ttgaaagtta tgagaactgt agagagttag ttgatcatag tttgtgattt 17760  
tgagggcctt taaaagtatt aaagcagtgg cagctgccac acacagacat gagagccagc 17820  
ctaaaacagt aaggtcaatc tgtttagaca gaaaggctgc agggcactgt ccaagctctt 17880  
gtgtaaggat tctgaccgca cagccttgta ctttggctgt gtgtaatgaa aagggttggg 17940  
atgagttagg gagagctagt gtgggagtag cttctagggc tgtttttaag gaacataaag 18000  
aggagtgggg aaaggattta ggatctatgg ggtcagctag gtttcctttt gtgagtttat 18060  
gtaatggttt agtcaggatg gcaaaaccag gtatccaaag gtgaaagtac ccaaccatgt 18120  
ctaggaagga aaggatttgt tgctttgtag aagggattgg ggtttgggag attagccgga 18180  
cacagatcag gagggagagc acttgtattt ttatgaagaa ttatgccgat aggtaacgga 18240  
tgaggaagaa atttgggcctt tggaggggga tacacgatat tcccttgaga atagatgttg 18300  
gaggagcagg aggggtgtcct gttgggaaga ttcataaggag gggctataaa gtagaaggcc 18360  
atcaaaatat tgaataaggt gacaagcaga tggacagaaa agtaaattat gagaaagggc 18420  
ttgactgaag taatggaggc tgtccctgaa gccttgtggc agtacagccc aggtaagtgt 18480  
ctgagactga tgggtgtcag ggtcagtcca agtgtaagtg aagagaggct ggggtgaaga 18540  
gtgcaaagga atagtaaaga aagcatcttc aagatccaga acagaataat gggttgtgga 18600  
gggaggtatt gaggatagga gagtatatgg gtttggcacc acagagtgga taggcaagac 18660  
aatttggttg ataagctgaa gatcctggac aggccttagt cccttcaaag cctgttgttg 18720  
gatgggatac tggcattgag caggataagg gtaattaggt tttaatggga tggtagggtt 18780  
gcgtgatcgg tcaccaagga gggagtagag gtatccata cttgtgggtt aagataggga 18840  
gtcaggaggg gaggttgtga aggaggcttt gaactgggga aaagggtggc aatgagggtg 18900  
ggctgtagcc caggaatagt cagggaagca gataatttag ttaaaatgtc tcaatttaat 18960  
aaggagctg ggcaggtggg aataactaaa aaggagtgc taaaagaatg ttgtccaagt 19020  
tggcaccaga gttggggagt tttagaggt ttagcagcct gaccatcaat aaccacaaca 19080  
gttatggagg caagggaac aggccttga aaggaaagta atatggagtg ggtagcctcc 19140

atattgatta agaaagggac agacttacc tccactgtaa gagttaccca aagtgtctgt 19200  
gatgatccag gaggcttctg aggtgatcag gcagtgtcag tcttcagctg ctaagctgag 19260  
aagatctggg aaggagtcag tcagagagcc ctgggccaga gttccagggg ctctgggagt 19320  
ggctgacggg caagttggac agtccgattt ccaatgcggt cccacacaga tgggatacag 19380  
ttaggagga atcctgggct gtaggcattc cttggcccag tggccagatt tctagcattt 19440  
gaagcaagat cctggaggaa tgcctgacca cagtggttta ggtgttttga agttcttgtg 19500  
tgctggagat gtggctgagg tttttctcac agcagaggca agtaattgca actcagaaat 19560  
acattgccac ttggctgtct cttctctatt attgtacacc ttgaaggatga ggtaattaa 19620  
gtcctgttgt ggggtttgag ggccataatc taatttttga agctttttta atgttgggag 19680  
tggattgggt aataaaatgc atattgagag taagacagcc ttctggcccc tctgaaccta 19740  
gggcagtaaa atgtctaaga gttgttgcca aagggaccat ggactgggct gcgttttcat 19800  
atttgatgaa aaaaaagag cctaaatgct aactaatttg ggagaggatca gataaagtaa 19860  
aaggaacatt aatcttgact atgccttcag ctcttgccac ctctctaaga ggaaattgtt 19920  
gggcaagtgg aggagtgcta gtcgtggaat gaaaccataa gctggactgg gtgtgaggag 19980  
gggaggtgat agaaggatta cagcgtaggg gagtagaggc tgaggaagaa ttgggacctg 20040  
gctcagcctg gtgaggagtg gcctgggtgag gagcagcctg gggaggagga gagaggttag 20100  
atgggttcgt agaaaagaag gattcaaagg actcggagct tgggtgaggag actgaaggaa 20160  
cagacaggag agaaagaaga aagatttggg acaagtcgca ttgggagcag agactaggaa 20220  
gggagtgatg tgtaaagaat gcctggacat caggcacctc agaccatttg cccattttat 20280  
gacaaaaatt atctaagtct tgtaggggtg agaaatcaaa agtgccattt tctggccatt 20340  
tggaacaatt atcgagtttg tattggggcc aaatgggtgtt gcagaagaaa ataagatgct 20400  
taggttttag gtcaggtgag agttgaagag gttttaggtt ttttagaaca caggctaagg 20460  
cagaagaagg aggaatggag ggtggaaggc tgcccataat aaaaaggtaa gtttagagaa 20520  
aagagaggat agagacacag agagaggggg tggtggtact catcagccag gggaggtggt 20580  
acttgccacc aagtgatgg atcaaggcag tcatccccac ggtgatcaga cacctctgaa 20640  
atgtgggtga ataatcaggc aggtgtccct gcagtgatta gacaccaagg ggagactgtc 20700  
ttcccagtc cgtgaccggt gctggagtitt tgagttcaca gataaaacac atctcctctg 20760  
tctctaccag aaagggaag gaactgaaat taaggaaggg agagattgaa ggggtggagag 20820  
atagcaagag agttggaaaa gagaataaaa agaggccact tactcaattt aaaattggtg 20880

agatgttcct tgggctgatac tgaggacca aggttgtagg tggatctcct cacggaatga 20940  
gggtgaggac aggggactgg tctccagaag gagttccga gtcctggatc ttcagcacca 21000  
aatgtcatgt gcatccatgt gaagagagtc caccaacagg ctttgtgtta tcaataaagc 21060  
tttttaatac ccttgggtgca ggtgggctga gtctgaaaaa ggagtcagca aagagagata 21120  
ggggtgggtc agttttataa gatttgggta ggtagtggaa agttacagtt agaggtgggt 21180  
atctcttgag ggcagaggtg ggggtcacia ggtgctgggt ggggaaatcc tgagacttat 21240  
catccaggga aggagtgtca caaggtcgat tgatcagttg ggggtggggca ggaacaaatc 21300  
gcatgggtga atgtcatcag ttaaggcagg aactcactat ttcacttctt ttgtgggttct 21360  
tcagtttctt caggccatct ggatgtacac gtgaaggta cggggatata tgatggctta 21420  
gcttgggctc agaggcctga cactaacctc ctgcagaagc cacaaaagggt tattacacat 21480  
aaaccatggt ttccacaggc aggcactctt gatgtggaaa attgggatag agcaggatta 21540  
aaacaagctc atcaaaaagg tcttaaagtt gattcttcag ttttctccac ttggagtta 21600  
gttcatactg tacttctgcc attatctcct tattattctg cggaacagca ggctgaatct 21660  
aaaaattgga aagaatttgt tgtcctactc acagctccaa ttgaatataa aaaacaggag 21720  
agggaggata aaaattggcc tataccgcct cctccagatg cagaaacatc tgtaccatct 21780  
ccttcagtgg cagaaataga gatcccagta caaagaattt tatgctctgc tgtcatagct 21840  
ggagagccct taggaccttg tgcttttctt atttctgtaa ggcctgatcc aaataatcca 21900  
cagcagttta ttcatgaaca ctctccacta gaatttaagt tgttgaagga attaaaaact 21960  
agtgtgggtca ataattggagt acaaagccaa tggttcctgg aggaaggaat gctagacata 22020  
gaactttggg agcaagtggg gagaaatctt aaacaacacc aggcacaaag gcatcaggtc 22080  
ccagtaaaat cttttatgtt aggggctttg agtagagcag ccctgggtgt tacacacaaa 22140  
agagcctaaa aagggaaggg aggaggaaat gtcacctgcc ttatcacctc cccttcctc 22200  
agtgccaaata tcttggggcc aaaataacaa agaggaaatg gaggtcttac ctaagcttc 22260  
tcctccaata gataggaaga aggacagagg atacgtaca gctatcagtc cctgtcttaa 22320  
gcaggcagca ttagaaggag agctcttagc cgggtgcagt ggctcatgcc tataatccca 22380  
gcactttggg aggccgaggc aggcagatca tgaggtcagg agatccagac catcctagct 22440  
aacatgggtga aacccgtct cactaaaaa taaaaaaat tagccaggca tgttgggtggg 22500  
cacctgtagc ccagctact tgggaggctg aggcaggaga atggcatgaa ccaggaggt 22560  
ggagcttga gctttcagt acctgagatt gcaccactgc actacagcct gggcaacaga 22620

gcaagactcc atctaaaaaa agaagaagaa ggagagctct taacctgctc agtaatgcaa 22680  
aatcggaag gcaatcaggt gtatgtttat aaaaagataa gaaaaaggca ttagaagcca 22740  
aaaccacgtg gccaagcagg cagtgggcag gagaaaatgc tcagaggcag aaaagctcac 22800  
agcgacaaag ccaacaaggt ctgcccagga cggcagcatc cctctggcaa aggagcaagg 22860  
gagcagcaca gacacaggca aagcctaaac aagtacaatg tggccacctc ccaggacctg 22920  
caccactgcc ctctggctct gtgggcagcc cattgcaaaa tttcatgtgt tacatctcag 22980  
gctatgattc tctgctaaga tgtaagtaaa atgtaagaat ttgaaaagca tcttttctaa 23040  
taatggccac tattgtcatc tctctcctat ccctgatgta gctttccaaa ttcaatttaa 23100  
gtaaaacagt aacctttgaa gggaaagaga ttacagaggg cccatgaatt agttgaagag 23160  
taattaaag ctaggcattgt aaaaccacac attacgcttt aaagaagaaa tttaaacctt 23220  
attaaatgat atttgttaaa ttagaaggta aaaatgttgt gccctgttgg gaacaggccc 23280  
ccaaatctgg ccataaactg gccccaaaac aggccataaa caaaatctct gcagcaccat 23340  
gacatgtttg tgatggccat gatgccacc ttgaaggttg ttggtttact ggaatgaggg 23400  
caaggaacac ctggcccacc cagggcagaa aattccttaa aggcatccc aaaccactaa 23460  
tgatagcatg agcaatctgt gccttaagga catgttcctg ctgcagacag ctagccagag 23520  
cccatccctt tgttttggcc catccctttg ttcccataa ggaatgcttt cagttaatct 23580  
atgatctata gaaacgatgc ttatcactgg ctgctgtca ataaatatgg gagtaaaact 23640  
ctgttcaggg ctttcagctc agaaagccat aagccccctg atttcccact tcccaccctt 23700  
tatttctgtg tgtgtgtctt gaattcctct agcgcctctg ggttatggtc tccacaacca 23760  
cgctggctctt ggcagtgcc ttctcagaaa gtgaaaaaga gttgtatgta agtgtagtga 23820  
aaacataagc atgaatcact gtcttaacct actgattaga tagtctttga tttgtacttg 23880  
ctaaaagagt cctaaattga gttcctcagc tagtgagtca ctgttttcaa gactgtttgc 23940  
cagattgaag tccataaact tggtcagccc gaaaactcaa ttacaagatc taagctattc 24000  
tgcctgtggc tttaagcaca tggttaaagt atattattta agtctctcct tctagatatg 24060  
ctttcagatt ttctttttta acttcttggt acttatttca gctttccata ttgataatta 24120  
atgcagtcaa ttgctcagtt atgactgtga tatcatcagg attcctttta gtaaaaggca 24180  
attcaaagcg gtattgcact ccccatacc taatgcttta aactgttta ctgatgggtc 24240  
tggtaaacat ggaaaagctg cagtctagta gagaccacat aattcaatca ctgatctga 24300  
gttcactagc actcagagag ctaaggttac tctgtttatt tattaaagaa tttttacaac 24360

cttaagctca ctctggactt tccagcctta tgtggcaaat gtagccatca atttatgggg 24420  
tcaagactta cttacagcat gggatatgag gcttacaaat gagactttga taaccagga 24480  
ttttaaatgt tgaagaacac gggatatcag agtgaaaaag gtttagggaa aattctgaca 24540  
agggaaaatt ctaacctgat atcaataact ggaaagacag gttaaaccct gcaaggggat 24600  
acattgacat tttttcttcc tcacttgctc ttttctgctg tctgaatatg ggcatgaggg 24660  
caagagtcac ttttagaccac caagtacct tgaggataga agccttatac tagagggtgt 24720  
gggaaagaaa aaacagaagg actcataaag aaaaaataa taaacctcag tattaagatg 24780  
gaaaaattcc cccaatttgt ctataggttg aacttcact ctattaaatt tcagctatgt 24840  
ttttgcagaa tttgatatgc tgatcataaa atttatatga aaatgcaaga gacacagaat 24900  
agtcaaaact ttgaaaagaa gaaagttaga ggacttacac ttgttgattt taaggctttt 24960  
tacaagcta taataatcaa gacaatgtgt tactgacata atgatagaca tattgatcaa 25020  
tatagacaat ggatgaatgg agtagaattg acagtctaga aataaaacct tatatatatg 25080  
gtcaatttat ttctttatgt attctgtcat ccagaatata taaagaacac cttcaactca 25140  
ataacaaca taccaacaag ggtgccaaga ccaatcaatg gaggaataa tagtcttttc 25200  
aagaaatttt gctgagacaa ctaagtattt atatgcaaaa taatgagttt gaatggctac 25260  
catatacaaa aattaactca aatggactat attaggtcag tgcaacagta attgcagttt 25320  
accaccatta ctgtttttt ttttttggtt ttttttttg agacagagtc ttgctctgtc 25380  
accagacca gagtgcagtg gcatgatctc agctcactgc aagctccact tcctgagttc 25440  
acgccattct ccttcctcag cctcctgagt agctgggact acaggcatct gggtaatttt 25500  
tttgatattt tagtggagat ggagtttcac catgttagcc aggatgggtct caatctcttg 25560  
acctcgtgat ctgcccacct cagcctcca aagtgcagg attacaggca tgagccacca 25620  
cgctggcct accattactt ttaatggcaa aaatgcagtt acttttgac caccctaata 25680  
gaactaaatg taagagctaa aactacaaa ctgttagaag aaagcatagg agcaaattct 25740  
aatgacatga gagttggcaa ttgtttttta gatatgacac caaaagcatc aaggacaaaa 25800  
gaaaaaatg gataaattgg acttcctcca aattaagaga acttttgtcc tgcaagcaat 25860  
actattaaga aagtgaaaag acaagtcaca aaatgggaga acatttttgc acataatata 25920  
tttaataata ggctgacatc cagaatacat aaatacctac aactcaatac caaaaagaca 25980  
gccaattta aaaatgggcc aaggatatga ataaacattt ctctaaagaa gatacaaaaa 26040  
tggtcaatat gcacatgaaa agatgctcaa tatcaatctc tattaggaaa atacaaatta 26100

aaacacaaaa tataaaacac aagatatcaa ttacactca ccaggatggc tgttatcaaa 26160  
aagacagata acaagtattg gcaaggattt ggggaaattg taaccttcat acattgctgg 26220  
taggaatata aaatttgcag caggtttga aaacagtta gcagtttctc aaaaagcctg 26280  
ggcatggtgg ctcatgccta caatcccagt gctttaggga gctgaggtga gaggattgct 26340  
tgagcccagg agttggagac cagcctgagt aacacagtga gacctcttt ctacaaaaa 26400  
gaagagagtt aaacataggg taccatataa gccagcaatc catctcctag atatgtacc 26460  
aagaaagttg aaaacatata ctgacacaaa aacttacata tgaatcttca tattagcctt 26520  
ataataatag ccaaaaagta gaaacaacc aaatacccat caactaatta aaatatggtg 26580  
tatctataca tattatttgg ccataaaagg aagtactgat acatgtcata acacaaatga 26640  
acctggaag cactatgatc tctgtattag tcagctcttg tattgctata aagaactacc 26700  
tgagactggg taacttataa agaaaaaggc ttaattgagt cacagttcca caggctgcac 26760  
agggatcatg gccaggaga cctcaggaaa cacagttatg atggaaggaa gagagtgaag 26820  
gaggaggtgc tacatacttt taaaccacca gatcttgtga gaagtcactc actatcatga 26880  
gaacagcaag ggagaagtcc acccccatga tccagtcagc ccagccagg cccaactcc 26940  
aatattgggg attacaattc cacatgagat ttgggtgggg acactaatcc aaacaatatc 27000  
attctgcccc agcccctccc aaatcctgtg tccttctcac attggaagat acaatcatcc 27060  
cttctcaaca gtttcatttc agtattaact caaaaatcca aagtctcatc tgagacaaga 27120  
caagtcctt ccacatatga gcctataaga tcaaaaagaa gttagttact tccaagatac 27180  
aatggaggta caggcatagg gcaaatatat ccattccaaa agggaaaaat tagccaaaac 27240  
aaaggggcca caggccccac gcaagtccaa aatcaagcag ggaaatcatt aaatcttaaa 27300  
gcttcaaaat gatatccttt gactccatgt ctcatatcca ggccacacca atgcaaggag 27360  
tgtgctcca aggccttggg cagctctacc ctgttgctct acagggtata gccccatgg 27420  
ctgctttcac aggttgcat tgagtgcctc cagcttttcc aggtacacag tgcaagctgt 27480  
tagtggatct accattctag ggtctggaag attgtggccc tcttctcata gctccagtag 27540  
acagtgcccc agtggggaat ctgtatgggg gctgcaacc cacatttctc ctctgcactg 27600  
cccaatagag gttctccatg agggctccat tcctgtagca tacttctacc tggacatcca 27660  
ggtgttttca tacatctct aaaatctagg taggggctcc caagccttaa ctcttgccct 27720  
ctgcatatcc gcaggcttaa taccacatgg aaaccaccaa tgcttatggc ttgcacccta 27780  
tgaagcagta gtctgagaca tatctgggcc ctttggcca tggctgggat gcagggaaca 27840

gtgtcctgaa gtggcacagg gcagcggggc catgggcctg gcccatgaaa ctttctttcc 27900  
tcctaggcct ccagacctgt gatgggaggg tctgcctcga cggtctctag aatgtgtttg 27960  
aggcatattc ctcatgtct tggctattaa tatttggctc ctctttactt atgcaaattt 28020  
ctacagcctg attaatcct ttccaaaaa atggggtttt cttttctact acatggtcag 28080  
gtcacaatt ttccaaactt ttacgcttcc ctttgaaatg taagtccag ttgcaggtca 28140  
tttctttgat cacaaatata agcatatatt tgtagaatca gccaggccac atcttgaatg 28200  
ttttgctgct tagaaactgc ttccaccaga taccctaaat cattgctatc aggttcaaaa 28260  
ttctacatat ctctagggca agggcacaaat gcctccaaga ctttgctaa tgcataagaa 28320  
aattgacctt tgctccagtt cccaataagt tccccatctt catctgaggt ctcttagcc 28380  
tggacttcat tgtccatata agtatcagca ttttcatcac aataatttaa ctagtctcta 28440  
agaagttcca aactttccct tatcttcta tcttctctg agccctcaa actgctcaa 28500  
cctctgccca ttaccgggt tccaaagctg cttccacatt ttcggtatct ttatagcaat 28560  
gtccattcc tgataccaat tttctgtatt agtctcttct cgactcctg taaagaacta 28620  
cctgagactg ggtaatttat aaagaaaaga ggtttaattg actcacagtt ccacaagctg 28680  
tataggaagc atggttcaga aggccacagg aaacttaca tcatggagga aggcgaagag 28740  
aaagaaggca cgtcttacgt ggctggagta ggaggaagag agtgaagggg gaggtgttac 28800  
acacttttaa acaaccagat cttgtgagaa ctcttact atcatgagaa cagcaaggga 28860  
gaggtctgcc tccatgatcc aatcacctcc taccaggctc ctctccaac attggggatt 28920  
atgatttgac atgagatttg ggtagggaca caactcaaa ccatatcaat cccatttata 28980  
tgaaatgtcc acaatagata aatctataga gacataaaat agattggtgc ttgcctagt 29040  
ctggacgtga caggagggtg tgagtaaaag aggcaatgga gtgataggta cagggtttct 29100  
ttttggggtg atgaaaatat tataaaatta gattgtggtt atagttgtat aactcttgaa 29160  
taccataaaa atatattgaa ttttccattt ccattttaaa tgggtgaatc ttatggtatg 29220  
tgaattatat ctcaataaaa ctgcaaaaaa tgcacaattt gcaattgcaa aaatatggaa 29280  
ccagtccaaa tgccatcaa tgagtggata aaggaaactgt ggtatatata tatatatata 29340  
tatatatata tatatatata tatatatata tatatatata cacacacaca caccatggaa 29400  
tactactcag ccataaaagg gaataaaaca atggcattct cagcaacctg gatggaattg 29460  
gagaccatta ttctaagtga aataactcag taatggaaaa ccgaatatca tacattctca 29520  
ctcataagtg ggagctaagc tatgaggatg caaaggcata agaataat aatggacttt 29580

gggaactcag ggaaaggggtg agagaggggt gaggaataaa aggctaccca ttgggtacag 29640  
tgtacactgt tcaagtgtatg gctgcaccaa aatctcagaa atcaccacta aagaacttat 29700  
ttacataacc aaataccacc tgtttctcaa aaacctattg aaattaatta atttttaaaa 29760  
actgctgaaa tcaatagtga aaggatggac tattcaataa tgacacagtt aattgaatat 29820  
catattttta aaattagatc cttacctcac actataacat aacaataaat tccagggtgaa 29880  
ttatagacca aatatgaaaa gcaaaatttt aatatttttag aagacaatth ttatgacctt 29940  
aagttagaaa atgattttta aaaacaggat gcaaaaacac taatcataaa gagatattht 30000  
aggccaagca tgggtggctca cacctgtaat cctagtactt tgggaagctg aggcagggtg 30060  
atcacttgag gtcaggagtt caagacaagc ctggccaata gggtgaaaca tgtctctact 30120  
aaaaatacaa aaattagctg gaaatcgctc gaaccagga ggcagaggtt gcagttagct 30180  
gagattgtgc cactgcactc cagcctgggt gagagagaga gactccacct caaaaaata 30240  
aataaataaa aataaagaga gattttaata aggtgcatta aaataaaaaa ctatccatca 30300  
aagacaccat gaataaagtt aaaataggcc acaatgagaa tatatttgcc atgaattttt 30360  
tctttttttt tgagatggag tcttgctctg tcaccaggc tggagtgcag tggtgcaatc 30420  
tcggcttact gcaaacttca cctcccaggt tcaagcaatt ctctgcctc agcctcctga 30480  
gtagctggga ttacaggtgt gtgccacat gcctggctaa tttttgtatt tttttagac 30540  
acggggtttc accatgttgg tcaggctgag ctcaaaccct tgacctctg atccaccttc 30600  
ctcagcctcc caaagtgtg ggattacagg catgagccac cgtgcctggc ctacatgaa 30660  
tattttttta aaggtagcat ccagaattaa taatcttctc caacaaatth cattagtagt 30720  
cagggaactg caaattaaaa tcaaagtaa atactactth ccactcatta gactaaaatc 30780  
cattcaagtc tgataatacc tagtactgag ttggagtaat agaaactgct aatgggacag 30840  
ttagttggtc atcactttgg agagaaatta gtcagtatct agtaaaagtt agtgatacac 30900  
cttccattth catctgttct gtgctgctac caaagaatac ctgagactag gtaatttata 30960  
aataatagaa atgtatttct aatggttcta gaggctgaga agtccaagat tgaagggcc 31020  
gcctctgcag agagccttct tgctgtgtca tgccatggca gaagggcaa gagagggcaa 31080  
gagagagcaa aagcaaattc acagcatcaa tcccttttat aatcagcatt actctattaa 31140  
tgagggcaag accctcatgg cctaatacct tctaaaaggt cacacctctt aatactattg 31200  
caatggtaat taagtttcta atacatactt tttgggagac attttcaaac tatagcacct 31260  
accctatagc ccaacatttc tactcctagg agtatgcct agagaaattc tgcataaata 31320



tctaaagaga ggccattggt gcattgttag gtactggaaa attggaatca attactatgt 31380  
ctaccagcag cagaagatgg ctttttaaaa gttttggttt attcatgaaa tggaatattg 31440  
cataaagtat gtcctatctc accagatgaa aacatttttc actaggacta tttcaaaagt 31500  
agtcttatca ctgggcttct ctattatgca taaaaatttt aagtgaacat gttctttgac 31560  
ctagtactcc tacttttagg aatttgccca aaagggacaa ttatactact gggataaatc 31620  
tttgaatcat aaagtaagtt gtaaattgta caagcagtat gtcttatttt tattttaaagc 31680  
acattaacaa tattacacat atagtaaaaa ataaataaat aaaacatgtg aataataaac 31740  
accaattta gaacaagtgt tgacagtgga gagggaaaga gagagaaaga aggagaaatg 31800  
gggagtggga gcgggtacac aaggaaattt tagttgcagc tccaaatttt tactttttac 31860  
acaatgaagc gaatatggca aaataagatt tgtaaagtt gggcagcagg tacacagata 31920  
ttctatcatt atcctttgaa tatttctgta gatttaagtt gtccattaaa aaaataaaat 31980  
acacacataa ttttaagat tagttttttc tatttcctgg ccttcgcatg cactgttaac 32040  
tttacctgga attctttatg cagtaattaa gagcaaaggt gtagagcaag actgcttgag 32100  
cttggatccc agcactgagt tgatttaggg agaataactt aatctcttaa tccaagaga 32160  
aaatatgata taatagtttt gagtcataa agttttcata agcattaaat gtgacctata 32220  
tatgtaaagc aatctaacag tgcctatagt atttataagt gtctgcatta ccaaattcat 32280  
cattatcatg gcatgtcatg tcaccatcca ctacattacc atcactgtca ccatcatcat 32340  
catcaccacc accatcatca ttaactccct ttgtctagtc aattcatatt tgttcttcgt 32400  
attttagata cctgttaaaa tattttttca aagatgtcta ctctgattct tcagtacaaa 32460  
tttgatttaa taagatccta tcattttgtc caaatactta taaaaatttg tagttctata 32520  
tttaatgtgt ttgtttgtt taacatctct ctctacatt gtgttaagtt ttttaaagag 32580  
aaggtaaggg ttaaagagag acatagagag agaaagagag acagagagag agagagagcg 32640  
gttctacagc aatacaggta tattagaaaa acctgcaaag gtggggacca gcttaatgcc 32700  
agagcccccc actgcttata ggctggggta cttataggtc tgggggtact tataggcctg 32760  
ggtgggtggg gtctgagcag tatggcttgc tgcccaagaa gatgttgata agacgttccc 32820  
atgatgaggc agtttgggtcc ttgcttccat agagtgtgat gcttcttgca ctttttccca 32880  
gcagaatgtg gtagggatgt tccttcaggt gggcctttgc ctggcagggt atgataagga 32940  
tgttcctgtg ccttggaaac aggtagttag acaggatgtt tctcacagcc tgaaccccca 33000  
tggaatgttt cactttgacc aggtctgcg aaatagcagg gggcttacia aatggtgtag 33060

tttggactaa caccttggaa cacaaaagtt tcttggggcc aaggctggcg tattagtctg 33120  
ttttcatgct gctagtaaag acatacctga gactgggtaa tttataaaga gaaaagaggt 33180  
ttaatggact cacaattcca catggctgga ggcctcaca tcatgaggga ggcaaaggag 33240  
gagcaaaggc acgtcttaca tgggtgtagg caagagaacg tgtgcagggg aactgccctt 33300  
tataaaacca tcagatcttg tgatacttat tcactatcaa aagaacagca cgggaaaaat 33360  
ctgcctccat gattcaatta cctcccacca gattcctccc atgacatgtg gtaattatgg 33420  
gaactacaat tcaagatgaa atttgggtgg ggacacagtc aaaccatatc agctgggtat 33480  
gttttattca cctttttata ccattgtca tgtcttctgg acaaacaatg gatgtaaaat 33540  
ggtatagact cctgagtact catttgtga atgacaaatc tatgaaccat ttgaccagta 33600  
tgcagcagcc attaaaatta tgtttatgaa taatttacag catggaaaaa tttgggggtg 33660  
ctagtagaaa aacaaaaagg tacaaaagga tatatataat aagcctacaa tgccatataa 33720  
acaatactaa cagcaaaaac aaacctataa attgggggaa gatggggcag atagaagtaa 33780  
cctaaaatac taacatgttg ttttggggtc atgaaattat aatgattat gcaccctta 33840  
atttttactt tctatgtttg atttttctat ggtaaattgca tttttattga ggtggaattc 33900  
acataacatg aatgaaaaa tttagtggca tttattatat tcacaatatt gtacaaccac 33960  
tagctctact tccaaaacat tttcatcact ccaaaataaa accttgtacc cattaagcag 34020  
ttactcccca ttatttcctc tcttagctcc tagcaaccac caacctgctt tctgtctcta 34080  
gggatttatt tattctggat attccataaa aatggaggca caatatgtac cttttatgtc 34140  
tggtctcttt caccaagcat gtttttgagg ctaatccaca ttgcagcatg tatcagtact 34200  
tcatttcttt ttatgaataa ctgtatacag accacaattt gttatccatt ttttggttta 34260  
tggacatttg ggttgtttcc atctctcaac tattgtgaat agtgctgcta tgtatatattg 34320  
tgtacaagaa tttggttacc tattttcaat tcttttatgt atatatctaa gatgaaattg 34380  
cagggttata tgctaaccct atgttttagca ttttttttta ggaaccatta aactgttttc 34440  
caaactgat gccccatttt atattcctac tagcaatgta agcaagttcc aatttctcca 34500  
tatcctcaac aacacttggt attttctatt tttgttatag ccattctaatt gagtgtaaag 34560  
tgatatatca ttgtggtttt ctttgcatth tccttatgaa cattgatgtt gagtaccttt 34620  
tcatgtactt tttggtcatt tatatatcat ctttggagaa atgcctcttc gtgtatgttt 34680  
tgcccattht aaaactagat tgtctttgtt gttgacatgc atgcattctt taaatattct 34740  
gcatactagg cccttatcag atatatgatt tgcaaatgtt ttttctcatt ttactggctg 34800

tcttttact ttattgataa tgtcctttga tgcccaaaag ttgtttatit tgatgaagca 34860  
tatttatcaa tttatttctt ttattgctca tgcttttgat gtcacctcta agaatttata 34920  
accaaatcag aggtaatgaa gggtttacccc tctattttct tctaagagtt ttatagtttt 34980  
gactcattta cttaggctgc tgattcattt ttagttaatt tttgcatatg atgtgaggaa 35040  
gaggccaac tttactcatt tgcatgtgga tattcagctg tgccagcacc atttgtgaag 35100  
agtctatcat ctctcattt aataatagta ttgacacctt tgttgaaagt caattgataa 35160  
taaagtatg agtttatttc tggaatctaa attctattcc attgatctac atgtctatcc 35220  
ttgtatcagt atcacactat cttgattact gtagatttgt agtaagtttt gaaactagaa 35280  
agtgtgagta ctgcaatatt cttcttttct ttttttaaag attgtcaggg cctcttgcaa 35340  
tttaataggg atatgaggat tgacttttct attctacaaa attaaaattt tgtagagat 35400  
tgcatgaca ctgtaggtag ctttcagtaa cattgccatc tcaacaattt taagtattct 35460  
aatacatgaa tatgagcttt ctttctcttt atttaggtct tctttaattt ctttcagcag 35520  
tgttttgtag ttttggggta caagtcttct acctttaaat tttggtgaaa tttattccta 35580  
ggatttgcatt ttttttatgc tattgtaaat aaaattattt tctcaatttc ctgttgatg 35640  
ttcattgcag gtgtatagaa actcaactga ttctttgtgt tgatcttatg ctgagaccag 35700  
ctcagttggg gagaccctaa cctagaagca ctagaggaat taaagacaca aacacagaaa 35760  
tatagaggtg taaagtggga aatcaggcgt ctacagcct tcagagctga gagcttcaaa 35820  
cagagattta cccacatatt tattaacagc aagccagtca ttagcattgt ttctatagat 35880  
attagattaa ctaaaagtat cccttatggg aaacgaaggg aagggtgaa ataaagggat 35940  
gggttgggct agttatctgc agcaggagca tgtccttaag tcatagatca ctcatgctat 36000  
tgtttgtggt ttaagaatgc ctttaagcgg ttttctgccc tgtgtgggac aggtgttctt 36060  
tgccctcatt ccggttaagc cacaaccttc cagcgtgggc attatggcca tcatgaacat 36120  
gtcacggtgc tgcagcgggt tttatggcca gttttggggc cagtttatgg ccagattttg 36180  
gggggcctgt tccaacaat cttatactt gcaattttgc tgaatttgct tgtaacttt 36240  
gatagttttt ttgaggatta tttgggattt tctacatatc atgtcatctg tgaataaaga 36300  
tagttttgct tctttcttct tcatgttgat gccttttatt tccttttctt gcctaatttc 36360  
cctggctaga acttccagta tgatgttgaa taacctgggt gaaatgggca ttcttgtctt 36420  
tttctgatg ttagagagaa atttttcagt ctttaacct tgagtataat gttagctgtg 36480  
ggttttttac aaatatcttt tatcatgttg aggaagttcc ttctactcc tacttcttgg 36540

agtgtttttg atataaaggg tatttaattt gtcaaagct ttttctgtgt cagttgagat 36600  
tatcatgtga gatttttttt ccttcattct attagtgttg atgttacatt ggttgatttt 36660  
ttatgttgta ctacatttgc attctttata taaatttcac ttggatcatgg tgtataaccc 36720  
ttttaatatg ccattggatt tagtttgcta gtattttgtt tagagttttt gcatctatat 36780  
tcataagcaa tatcagtcca caggtttttt gtggtttatt tgtctggcct tgctataatg 36840  
gtaatgctgt cttcttagaa tgaatgaggg agtgttttct cctctttcat tttttaaacg 36900  
tttgagaagg agtgatatta atttttcttt aaatgtttgg tagaacttac cagtgaagcc 36960  
gtctggttct taacattttt ctgtgttggg aggtttctga ttaccaattt gatctcttta 37020  
atttttacag atcttttcag attttctatt tcttcttgag taacttttta gcaatttatg 37080  
tattttagaa atttgttcat ttaatctagg ttatttaatt tattgggtgtg cattttttca 37140  
tagtattatc ttataatctt ttaatttttg taaagttgat aatgtcccca ccttacctga 37200  
tcttagttat ttgtgtcttc tctgtattct ttttgtcttc ttcttctgtc ttagcatagc 37260  
taaaggtttg tcaactttgt tgatctttta aagagtcaac ttttgctttc agcatgcatt 37320  
actttttaaa tagaaatata tacacctaag ttgcattaca aaggagttgt cctccacaca 37380  
cttattcttt cccaccatca gaggtttatg gtccccgcaa aagtcaccat cagttgggct 37440  
caactccaat cagtcatggg aggtcagggt ccatctcatt gtctccatca ctcatgccca 37500  
cccagggtta gtctaactat gttcaccaat cagaacctct gccacatcag ctctgtgggt 37560  
ttctctcat gccatctgta ccaacaatga gcacagtctg ggtttcctga tgttttctat 37620  
agcatgggtgc ccctccctgg gacacctcag aagccacaat gatattcatt aaacttcttc 37680  
ctgcaagtac tccctctatt gtccttcta ctcaccaagc ttagtgtcag ggaatatgct 37740  
ggtggggagt atgaatctta gcttctcact ccagactcg gctcccaacc tgctgttgcc 37800  
aagtcttggg gacatctata aatgccttct aaatacctgt cttggcctat ccccagccac 37860  
agattcctcc ctagagcagg ctaccttga ggcatctata ctgagatctt aatcacagag 37920  
acatttaaaa catctaggct acaaaagaat tcctactata gggttcaa at gaatttcttt 37980  
ccgtcacttg agacagcttt ttagcaagta catgtattaa agattctgat ttcccctttt 38040  
ttctcctaca gtttgtttgg cctaaaggta tgacatctaa tctgctgcat ttacactcta 38100  
agtcaaaatt accattttgt tcttttaatt tctatttcta atcatacatt cttgtctact 38160  
cctggttcat ctggagacaa agttgaactt agaagatgga ggagaaattc ttatctgccc 38220  
tctgctagtt gacacttctt ttccaagaat catttgcagt tgctgggctt tcttctgtgtg 38280

actctatgcc ctgttgtgtt actttttcat ttgtgacaaa aacagtggta atagtttgct 38340  
tcatttttat tatgaagact tgaccaggat aggtaggaac ataattactg ctttttctgt 38400  
gggcatcata ttgggtccaga tcatgtttta ccagaattga agatgtaaaa tcctagaact 38460  
cactaatcta ttttagtagg tcacaggaag catgcaaacc ataaaaaccg caatgaacca 38520  
aaagcatctg tgttgacaag aggcaagaat ttctctatit tctaaaggca ctaactgaac 38580  
aatctattg cccattactt aggaaattgc taagggcatc gttaaagtac ttcaggctgt 38640  
tgaaaaacct ttctgtctt cttgccccac caccaattct ctctagctat gctttctctc 38700  
acatgttctt gccatccatg gagtggcaga gaggttctga gtacaactct aactttcagt 38760  
ttcaatggcc taatcccca ctcaactgct gaccttgagt gtaaaaataa acaagatctt 38820  
aaacatctta gggccagcat tctgggtctt cttttgttat ttggggagca taaactattc 38880  
tcatatcatt ggcttgacaga aaaattgagc ttctctctt ccttgcccca tgtcaccttg 38940  
aggtgaccac agccctgcct tctatgtaat cctgcttggt cagcaggcac atcagagctc 39000  
agtggcttgt gacatacttt ccttcaagcc tgctcgaagg gccatactca tcattgagac 39060  
tgggaaacctt agaaaccatg aaccagtgct caatgggtag atacagaatt ctcaaactca 39120  
tgaaaaaaca tcctttttta ctctctccgt gtgcataaag aattctaaga tgtactgatc 39180  
aagattccca attttctaac tatctattaa tatatggacg aggtagaag aaagttgcaa 39240  
gaaaaaaatt tgtttgactt gacggttgtg tggttatttg ccacactccc ccagatccac 39300  
tctgagtccc aggatgctga ttttaggggc tacattgcct agactgtcca ttattccctc 39360  
ttcccatctg gttcagtcac tgggaagcac tggtaggagg tcagagtggg agaaggaggt 39420  
taggatactt tctgcccctg ctgtctact gctttgctga acttctagca gtggctgagc 39480  
catcaacctg cagctctcaa ttccagctgt ctgtagcact caagtggat tgtttattct 39540  
tttgatcctt ctagctgtta aggaagaaaa aaataatttt ttctcaatg ctcataagtt 39600  
cttggaatgg acccctgtaa caaaagacag attaacacga gaaaagtta ttaacgtaca 39660  
tattttatac gtacatagga gctatccagg gaatgaataa ttcttaaaaa ggtgactttg 39720  
aattccagct catatagcat cttcaacaaa gttcagtaac attttagaga tatgacaaga 39780  
caaagaaaat gaactttgag cctctaggga cagtgacttg taggaaggca aaaggaataa 39840  
atggaggtaa aggctggta gtaatacttg ttaatgaaga ttctctggt gccatctcca 39900  
ggtccacaag gatitaaatt tgtcttcagt ggtgaacctt tgttcaccct ggcagaaggt 39960  
gtggaggggg gtgcagatcc gttttgtctt tgtaagtcta tatcctgctt ttagacaaat 40020

aaagggaggg aaaagagctt tccttcatct gcttcttaat tgccttcagc tcaacaatcc 40080  
ttatgcaaaa gaggtacatt ttaggggtgc aaattctggc ctcccacaaa gcatagggat 40140  
gacagaccac ctcaccatcc ctgttgcttc ttttaagcct gctcaccctt ccaaaaatat 40200  
tttcattcta tactgtctct tcaaaatctc agcggagggt gccctctgtt atcctgccct 40260  
ctgtgtcagt ataagccaaa ggittgaatc ctggctctgc aactatctac ctctgtgcct 40320  
ctccttgttt atgaaattac agggctggag acaaagatca caatgtgaag acaaaattgg 40380  
agagcgggcc taatcagcca gagcaaaatt tctggctctt gctcttcccc atcctgggtt 40440  
gaatcatagg aacaggtggc aagatgccag ggtcaggaga ttccagaagt ggcagcaagc 40500  
tcagtgttac caggtcaggg atgacctgtc ttattattga aatctcagag atatgctcca 40560  
attccggccc agagacacat tgagagacaa ctggggaact tgctatgttc ctgaacaggc 40620  
aatgagctgt cttccaagaa aaaacctgag acccttcaag tctcaggtct tacttagcac 40680  
atataccagg tcttacacag gacacatggc tacaactgac tgaaatctgg gctgggtgta 40740  
ggagctcaca cctgtaatcc cagcccttca ggaggctgag gcaggcagat tgcctgagcc 40800  
caggagtctg agaccagccc gggcaacatg aaaaacccc atctctacaa aaaatagtca 40860  
ggcatggtgg catgcacctg tagtctcagc tacttgggag gctgagatga gaggattgct 40920  
tgaggttgag actgcagtga agcatgatca tgccaccgca ctccagccta ggcaacagag 40980  
caagatcttg tcgcaaaaga aagcaaaaac acaacataac acaacaacaa caacaacaac 41040  
aacaacagca aaaaagccaa cttcttgaaa tctggaaagg acacctggac tgccctgagc 41100  
atttgattgt tgttggctct agcagtggat gcatccttca acctctggca ctctgcaggg 41160  
ctcagactgt tctgttctgt ttgttacctg tggagtgcct gccagaccct gctctagctg 41220  
ctttagggtcc attaccctc atagaccccc agtcttgta ttcatatttc atatttggga 41280  
aatggaaact tagaaacttg ccaagtccac agcatgagat cctgcctccg gtgtctgctg 41340  
gattccagaa agtgccaggg gccaaacttag atgacaccat gttctctgca caatcttagg 41400  
aatgctccta gtctgatgtc cccattgcaa aatttacatt atcttttaac aaaacgtctt 41460  
tccaaggagg ggcatttaaa ataactgagg ttcttcttgc taaggacgtt cctgacacaa 41520  
gagataattt agcatttcct tttcattaaa aagtttgaaa tctgttaatt tgtgataatg 41580  
tggatgaacc tagaggatgt taagtgaat aagccacaca cagatagaca aataccacgt 41640  
gatctcactc ttatgtggaa tttttttta aataagttgc ttagccgggc atgatggcac 41700  
acacctgtaa tcttagctac tcaggaggct gaggtgggag gatggcttga actcagaagg 41760

tggaggtagc agtgagctga gactgtgccg gtgcactccg gtctgggtga cagaatgaaa 41820  
cccaatttaa aaaaaaaaaa aaagttgcta tcttagaaaa agacagtaga gcagtggtta 41880  
ccagagactg gggaggaaaag agaggaggtg agaatgggca gcagttgatc aacgggtaca 41940  
aagttacat gagataggag aaacaagtgc tgggtgctctg ctccaagtag ggtgacggta 42000  
gttaataatg aattctgtat atataaatag ctagaagaga gggttttcaa tatcattatt 42060  
atttcaaaag aatgataaa tgtttcagag gatggatatg taattaccct gatttgatca 42120  
ttgcacaatg tatacatgta gcaaaacatc acattgtgtc ccataaatat atacaattat 42180  
tatgtgaatt aaataaaaaa aaatttttaa gtcttatcta aatgaaattt ctaaccagat 42240  
tctgaatcca tgataccact gaaaccagca cacatgatcg cagtaaaacc tcattatact 42300  
tcctccacta tcaccaatac cctttattct ctggaacatg aaacattctg ttgtgctcat 42360  
atcatgcaa ttatcactag taggagagca gagagtggaa atgttccagg tataaagacc 42420  
cacaagataa agaagctcag agtcggttaga aacaggagca gatgtacagg gtttgccctga 42480  
ctcacactca aggttgcata agcaagattt caaaattaat cctattctgg agacctcaac 42540  
ccaatgtaca atgttcctga ctggaaaaga agaactatat ttttctgatt tttttttca 42600  
aatctttacc attagttgcc ctgtatctcc gccttcactt tctgcaggaa actttatttc 42660  
ctacttctgc atgccaagtt tctacctcta gatctgtttg gttcagttgc tgagaagcct 42720  
gacataccag gactgcctga gacaagccac aagctgggtga gttgtaggca ttttttccat 42780  
tactttctga ttcataggct caacgcacct caaagctgga aatgccgggt ctgggtacac 42840  
cctggggaac tgcaaagcct gcacacttgg gggaaatgat caagatgaga ggcaggggtg 42900  
gggatggcat gtgcaccagg agatgttaga gaaaccctga ggaagagcag cgtgcagcag 42960  
gtgatggggg agagtgggca gcaagcgagg ccaggacagc cactctgctc agtcaccagt 43020  
ccacacacc agggtctcac tctgccccctc tgagcaccca aggacgttaa agagctggaa 43080  
ctgttagtct aaatatagga ccatccaagc tctgaaccaa aatgtgtccc ttgcctcaac 43140  
tcaggagatc cacagaggca gaagtaagga atttatittc tgaaagatag atttctatca 43200  
gttctgggtg acatgttctg acacttgaaa tgacacctag gacagcacat ttcaggcatc 43260  
ttgctcattg ttactgtag tagaagctac atgctagcca gttgtaaaaa tgaaattaag 43320  
taatgtgtgc acagcattta acatagcatc tgagcttcag gagcactcaa ttaatgacca 43380  
cagttgtgat tctttaggca gatgcatttt tttccaactt tgatcagagg tcttatttag 43440  
cttctccaga tttcaagaat ctggctcagt gatatgaaat acaagacttg tgaaaagtgt 43500

caattgcaag agaaatggaa ggataaagta tacaggtggg tggaaaagaa attcacagtc 43560  
actgccagaa aaaaaattct tgagaatcaa gtcctgatga tgtagggct tatagttctt 43620  
attataaaga gttttatgta ctcatcagt gaacatttat tggcgcctcc ttagccagg 43680  
tactatcata agagctgaaa ataaaagcat aatccagtcc ttgatcttga ggaacatgct 43740  
gtgtgtagca gataacataa taagtctta tctagatgca tgcagtgtta tgtgataaga 43800  
gtaatatgac agaggataca gattaggctt cacagagaag ggggatttga gcaggaggta 43860  
ttgaagggtg aatagaagct caccaatcat tttgggcaga ggggcaagga cctgcaaaac 43920  
cactgaagca tgaaggaaat ggtgagttta gggaaaatga agagaagatg gctgtgactg 43980  
aagcacagga tttgggattg gagaaggac tggaggtag gctgagaaga ggcaaactca 44040  
gaaaagatgt tgtgctgggc agtctggaca ttatcttga agcccaccac atataagtca 44100  
tagggctact ggaggtttta agctaaaagt gactattcaa tttcaactta agagaagata 44160  
ggttgagagg gaacatggct tgagatgagc catgagcaaa ggaaagacta caacaagcc 44220  
aggagtgagg agtgtgtgaa gcaagaaagt gacagttgaa agcagtgcag aggggatgaa 44280  
tctgagaggc atctatgagg tggaactcaa atgacatgat aataatacag ggcatttctc 44340  
tgtgtcagat gctgtcctaa gtccttactc cattgatctt cacagcaact cagcatagtt 44400  
aatattttat gcataaagaa atcggcactt gaaggagtaa ttggccccag attacactgc 44460  
ctataaggat tcaaatccag gtttgtttgg ctccaaaaac tggctcctaa ttttcagaag 44520  
gagaagcgac ccagggaat gcccaatttt gcttcttagg caatggagga atccacaatc 44580  
ggaaggagtt tticagcagtg cccatttgg ggtgggttga atttgaggtc cctgcatgat 44640  
accactttg ctacttcag tgcctaaaac tgagtatggt tcatagtagg tgttcaataa 44700  
gtgttgatgc agtgaataca tgcattggga gatatgcac aggcaatggg aaattcaact 44760  
ctaaggctta ggggaaagct ggagcttgaa gacagagctt tagaaaacag tagcatagaa 44820  
gggagtagga accatgagtt tagacaatac aattcaggaa gaactttgta gcaaggataa 44880  
agaggcaaaa aattaaagag gtgagagcta agtgtggtgc ctggggaatc ttaaggtgtg 44940  
ggcacgggga ggagatgcca gcaaagaaca tgaataaaaa gcggtagcac agcccctccc 45000  
atctggaagc caaaaagaat tgtaaatgga ggaagttagc agaaggatca aatacttgaa 45060  
gagggtggaa ttggaataaa accagggcatt ttgaaaatt gggttgtcac tgcaatctta 45120  
acaagagaag ttttggcagg atgatggagg cagaaagctg agagaatcat cagttagaac 45180  
gtttttgact tcagagaaca gaaaatgcag ttcataatgg ctttaaaaca ggggcttgtt 45240



tttctcccag caatttgaga ggccaaggcg ggtgcatcag gaggtcaaga gaccgagacc 45300  
atcctggcca acatggtgaa tccccatctc tactaaaaat acaaaaatta gcggggcatg 45360  
gtggtgcacg cctatagtcc catctactca ggaggctgag gcaggagaat cacttgaacc 45420  
caggaggtgg aggttgcagt gagctgagat catggccact gcactatagc ctggagacac 45480  
agcgagactc cgtctccaaa aaaaaaaaaa aagaaggcag aaggtgaata gttcaagggt 45540  
gggttttagga ctcaagtata ataggattct gcctggcttc tcatggttct ctaggtcttc 45600  
cattcatggc accatgccct cactaggcat gctgccagag caggaggggc aggtggaggg 45660  
ttctcttgtg tctgtcttat caggaagaa gagctttctc agaagcccc agcagactcc 45720  
ctttcatat tatggtccag caatgagtca cagacctatg caccacctgc aaaggagcca 45780  
gagaaaacaa acgcccagcg cttttagcct gaaaatgaga atctggtttg ctggggaaga 45840  
taaagggtgt cggaaaatgg ctgttgggta aatcattgat gtctgccact aggaatgaaa 45900  
ggcaaatcag gaactggcac acatgcttcc agggagatgg ctgcaaggga gagggcaaag 45960  
actgggaagt tgcttatgtg gtgccagact atttgaaga tcatggattg cgggtgtttgt 46020  
gttgtgtggt catcattttg ttctttgttt acagaacaga gaaagtggat tgaacaagga 46080  
cgcatttccc cagtacatcc acaacatgct gtccacatct cgttctcggg ttatcagaaa 46140  
taccaacgag agcgggtgaag aagtcaccac cttttttgat tatgattacg gtgctccctg 46200  
tcataaattt gacgtgaagc aaattggggc ccaactcctg cctccgctct actcgctggt 46260  
gttcatcttt ggttttgtgg gcaacatgct ggtcgtcctc atcttaataa actgcaaaaa 46320  
gctgaagtgc ttgactgaca ttacctgct caacctggcc atctctgac tgctttttct 46380  
tattactctc ccattgtggg ctactctgc tgcaaatgag tgggtctttg ggaatgcaat 46440  
gtgcaaatta ttcacagggc tgtatcacat cggttatttt ggcggaatct tcttcatcat 46500  
cctcctgaca atcgatagat acctggctat tgtccatgct gtgtttgctt taaaagccag 46560  
gacggtcacc tttgggggtgg tgacaagtgt gatcacctgg ttggtggctg tgtttgcttc 46620  
tgtcccagga atcatcttta ctaaagcca gaaagaagat tctgtttatg tctgtggccc 46680  
ttattttcca cgaggatgga ataatttcca cacaataatg aggaacattt tggggctggt 46740  
cctgccgctg ctcatcatgg tcatctgcta ctcggaatc ctgaaaacce tgcttcggtg 46800  
tcgaaacgag aagaagaggc atagggcagt gagagtcac ttcacatca tgattgttta 46860  
ctttctcttc tggactccct ataacattgt cattctcctg aacaccttc aggaattctt 46920  
cggcctgagt aactgtgaaa gcaccagtca actggacca gccacgcagg tgacagagac 46980

tcttgggatg actcactgct gcatcaatcc catcatctat gccttcgttg gggagaagtt 47040  
cagaaggtat ctctcggtgt tcttccgaaa gcacatcacc aagcgcttct gcaaacaatg 47100  
tccagttttc tacagggaga cagtggatgg agtgacttca acaaacacgc cttccactgg 47160  
ggagcaggaa gtctcggtcg gtttataaaa cgaggagcag tttgattggt gtttataaag 47220  
ggagataaca atctgtatat aacaacaaac ttcaagggtt tgttgaacaa tagaaacctg 47280  
taaagcaggt gccaggaac ctgagggtcg tgtgtactaa tacagactat gtcaccaat 47340  
gcatatccaa catgtgctca gggaataatc cagaaaaact gtgggtagag actttgactc 47400  
tccagaaagc tcctctcagc tcctgaaaaa tgcctcatta ccttgtgcta atcctctttt 47460  
tctagtcttc ataatttctt cactcaatct ctgattctgt caatgtcttg aaatcaaggg 47520  
ccagctggag gtgaagaaga gaatgtgaca ggcacagatg aatgggagtg agggatagtg 47580  
gggtcagggc tgagaggaga aggagggaga catgagcatg gctgagcctg gacaaagaca 47640  
aaggtgagca aagggtcac gcattcagcc aggagatgat actggtcctt agcccatct 47700  
gccacgtgta tttaaccttg aagggttcac caggtcaggg agagtttggg aactgcaata 47760  
acctgggagt tttggtggag tccgatgatt ctcttttgca taagtgcag acatattttt 47820  
gctttattac agtttatcta tggcacccat gcaccttaca ttgaaatct atgaaatct 47880  
atgctccatt gttcagatgc ttcttaggcc acatccccct gtctaaaaat tcagaaaatt 47940  
tttgtttata aaagatgcat tatctatgat atgctaatat atgtatatgc aatatatata 48000  
ggctcttgct tgatctctcc aggaggtagt gattatgaga agggggtgga gaatgatgag 48060  
ttccttcacc aggagcaaag gacggggatc gtgtggaacc actgcagaac tatttccgga 48120  
atcaactaag tggagagagc caggaaggct gcatcagaac ccagtaaagc ttcttgtctg 48180  
gatctgagct ggtttgtttt gtgcttgctt ttcctgcct tgccactccc ctactcttc 48240  
tcttttccc acagcctttt tcacatagct cttggctgta ggattgcccc actccaaaaa 48300  
ccagtgtgtg gaggtccagg agtgagacca ggaaagaatg tgaaagtac tacacaagga 48360  
ctcctcgatg gtcgtggaaa aggaaagtca attggcagag cccctgaagc cagtcttcag 48420  
gacaaagaag gagcctagag acagaaatga cagatctctg ctttggaat cacacgtctg 48480  
gcttcacaga tgtgtgattc acagtgtgaa tcttgggtgc tacgttacca ggcaggaagg 48540  
ctgagaggag agagactcca gctgggttgg aaaacagtat tttccaaact accttcagt 48600  
tcctcatitt tgaatacagg catagagtgc agactttttt taaatagtaa aaataaaatt 48660  
aaagctgaaa actgcaactt gtaaagtgtg taaagagtta gtttgagtta ctatcatgtc 48720

aaacgtgaaa atgctgtatt agtcacagag ataattctag ctttgagctt aagaattttg 48780  
agcaggtggt atgtttggga gactgctgag tcaacccaat agttgttgat tggcaggagt 48840  
tggaagtgtg tgatctgtgg gcacattagc ctatgtgcat gcagcatcta agtaatgatg 48900  
tcgtttgaat cacagtatac gctccatcgc tgtcatctca gctggatctc cattctctca 48960  
ggcttgctgc caaaagcctt ttgtgttttg ttttztatca ttatgaagtc atgcgtttta 49020  
tcacattcga gtgtttcagt gcttcgcaga tgccttgat gctcatattg ttcctatatt 49080  
tgccagtggg aactcctaaa tcaaattggc ttctaataca agcttttaaa ccctattggg 49140  
aaagaatgga aggtggagaa gctccctgaa gtaagcaaag actttcctct tagtcgagcc 49200  
aagttaagaa tgttcttatg ttgccagtg tgtttctgat ctgatgcaag caagaaacac 49260  
tgggcttcta gaaccaggca acttgggaac tagactccca agctggacta tggctctact 49320  
ttcaggccac atggctaaag aaggtttcag aaagaagtgg ggacagagca gaactttcac 49380  
cttcatatat ttgtatgata ctaatgaatg cataaaatgt taagttgatg gtgatgaaat 49440  
gtaaatactg tttttaacaa ctatgatttg gaaaataaat caatgctata actatgttga 49500  
taaaagattt aaaaacaact ggctgttttt ttacactgtg gtgtggaaga ttgtgttgtg 49560  
ttcacaactt ttcacttctt cccctgtgtg attacacaca cctgcccttg tgggtgtgact 49620  
tgcagtgcgc cctacaggcc acacaacccc atgccctcca ccactggctc tgctgctgga 49680  
atgtgagcag aagtgacatc tgcctcatcc aagcagagcc tcttgctcag ccacaggaag 49740  
gccattcca gatcacaccc gtcagcccgt gcgccctggg gaatgagaag acacaggag 49800  
ctgcagccac atataacatg agcaagaagt ctgtgtttgc tgtgataagc cactgagttt 49860  
taggggttgt ttgttaagaa gcacaaaaac cgattaagac atgtggtata tagtgacttc 49920  
atatatagaa tctggaaaac tatccattta tttcaatca tggaattcaa tatgacaagc 49980  
atcccggagg gtctacctat 50000

<210> 3

<211> 6065

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

ctggcgggac agcagcgtgg actcagctctc ctagggattt cccaactctc ccgcccgtt 60

gctgcatctg gacaccctgc ctcaggccct catctccact ggtcagcagg tgacctttgc 120  
ccagcgccct gggctctcag tgcctgctgc cctggagatg atataaaaca ggtcagaacc 180  
ctcctgcctg tctgctcagt tcatccctag aggcagctgc tccaggtaat gccctctggg 240  
gaggggaaag aggaggggag gaggatgaag aggggcaaga ggagctccct gccagccca 300  
gccagcaagc ctggagaagc acttgctaga gctaaggaag cctcggagct ggacgggtgc 360  
ccccacccc tcatcataac ctgaagaaca tggaggcccg ggaggtgtca cttgccc aaa 420  
gctacatagg ggggtgggct ggaagtggct ccaagtgcag gttccccct cattcttcag 480  
gcttagggct ggaggaagcc ttagacagcc cagtcctacc ccagacaggg aaactgaggc 540  
ctggaagagg gccagaaatc acccaaagac acacagcatg ttggctggac tggacggaga 600  
tcagtccaga ccgcagtgcc ttgatgttca gtctgggtggg ttttctgctc catcccacc 660  
acctccttg ggcctcgatc cctcgccgct caccagtccc ctttctgaga gcccgatatga 720  
gcaggagccg gccctactc cttctggcag acccagctaa ggttctacct taggggccac 780  
gccacctccc caggagggg tccagaggca tggggacctg ggggtgccct cacaggacac 840  
ttccttgcat gaacagaggt gccatgcagc cccgggtact ccttggtgtt gccctcctgg 900  
cgctcctggc ctctgcccgt aagcacttgg tgggactggg ctgggggcag ggtggaggca 960  
acttggggat ccagtccaa tgggtgttca agcaggagcc ccagggtctg tccagaggcc 1020  
gatccacccc actcagccct gctctttcct caggagcttc agaggccgag gatgcctccc 1080  
ttctcagctt catgcagggc tacatgaagc acgccaccaa gaccgccaag gatgcactga 1140  
gcagcgtgca ggagtcccag gtggcccagc aggccaggta caccgctgg cctccctccc 1200  
catccccct gccagtgcc tccattccca cccgcccctg ccctggtgag atcccaacaa 1260  
tggaatggag gtgctccagc ctcccctggg cctgtgctct tcagcctcct ctttcctcac 1320  
agggcctttg tcaggctgct gcgggagaga tgacagagtt gagactgcat tcctcccagg 1380  
tccctccttt ctcccggagc agtcctaggg ccgcgccgtt ttagccctca tttccatttt 1440  
cctttccttt ccctttcttt ctctttctat ttttctttct ttctttcttt ctttctttct 1500  
ttctttcttt ctttctttct ttctttcttt tctttccttt ctttctttct tttctttctt 1560  
tctttttctt tctttctttc ctttttcttt ctttcctctt cttcctttct ctctttcttt 1620  
ctttcttttt tttttttaat ggagtctccc tctgtcacc aggtggagt gcagtgggtgc 1680  
catctgggt cactgcaacc tccgtctccc gggttcaacc cattctcctg cctcagcctc 1740  
ccaagtagct gggattacag gcacgcgcca ccacaccag ctaatttttg tatttttagc 1800

agagatgggg ttaccatg ttggccaggt tggcttgaa ttctgacct caggggatcc 1860  
tcctgcctcg gcctccaaa gtgctgggat tacaggcacg agccactgcg cctggcccca 1920  
ttttcctttt ctgaaggctt ggctagagca gtggctctca gcctttttgg caccagggac 1980  
cagttttgtg gtggacaatt ttccatggg ccagcgggga tggttttggg atgaagctgt 2040  
tccacctcag atcatcaggc attagattct cataaggagc cctccaccta gatccctggc 2100  
atgtgcagtt cacaataggg ttacactcc tatgagaatg taaggccact tgatctgaca 2160  
ggaggcggag ctgaggcgta ttgctactc acccaccact cacttcgtgc tgtgcagccc 2220  
ggctcctaac agtccatgga ccagtaccta tctatgactt gggggttggg gaccctgggc 2280  
taggggtttg cttggggagg cccacctga cccaattcaa gcccgtgagt gcttctgctt 2340  
tgttctaaga cctggggcca gtgtgagcag aagtgtgtcc ttctctccc atcctgcccc 2400  
tgcccatcag tactctctc tcccctactc cttctccac ctaccctga ctggcattag 2460  
ctggcatagc agaggtgttc ataaacattc ttagtcccca gaaccggctt tggggtaggt 2520  
gttattttct cactttgcag atgagaaaat tgaggctcag agcgattagg tgacctgcc 2580  
cagatcacac aactaatcaa tctccaatg actttccaaa tgagaggctg cctccctctg 2640  
tctaccctg ctgagagcca ccaggttgtg caactccagg tgggtgtgtt tgcacagaaa 2700  
acaatgacag cttgacctt tcacatctc ccaccctgtc actttgtgcc tcaggcccag 2760  
gggcataaac atctgaggtg acctggagat ggcagggttt gacttgtgtt ggggttctg 2820  
caaggatata tcttctccca ggggtggcagc tgtgggggat tcctgcctga ggtctcaggg 2880  
ctgtcgtcca gtgaagttga gaggggtgtg tggctctgac tgggtgtgtc cagtggggac 2940  
atgggtgtgg gtcccatggt tgcctacaga ggagttctca tgccctgtc tgttgcttcc 3000  
cctgactgat ttaggggctg ggtgaccgat ggcttcagtt ccctgaaaga ctactggagc 3060  
accgttaagg acaagttctc tgagttctgg gatttgacc ctgaggctcag accaactca 3120  
gccgtggctg cctgagacct caatacccca agtccacctg cctatccatc ctgccagctc 3180  
cttgggtcct gcaatctcca gggcttcccc ttaggttgc ttaaaaggga cagtattctc 3240  
agtgtctctc taccacact catgcctggc cccctccag gcatgctggc ctccaataa 3300  
agctggacaa gaagctgcta tgagtgggc gtcgcaagtg tgccatctgt gtctgggcat 3360  
gggaaagggc cgaggctgtt ctgtgggtgg gactggaca gactccaggt caggcaggca 3420  
tggaggccag cgctctatcc acctctggt agctgggcta gtctctgggc ctgagttct 3480  
tcctctctaa ggtaggaatc accctccgta cctgccttc cttgacagct ttgtgcggaa 3540

gggtcaaacag gacaataagt ttgctgatac tttgataaac tgtaggtgc tgcacaacat 3600  
gacttgagtg tgtgccccat gccagccact atgcctggca ctttaagtgtc atcagagttg 3660  
agactgtgtg tgtttactca aaactgtgga gctgacctcc cctatccagg ccacctagcc 3720  
ctcttaggcg cacgtgaagg gaggaggccg gatgggctag aggttggagt aagatgcaac 3780  
gaggcactat tcttggctcc accacttgat atcagcctca gtttcttaca tgtaaagtgg 3840  
atacaaccgt accccctcca ccgtaggttt gccgtgagat tgaaatgaga gagcgttcga 3900  
accgtttggc acagcacctg cacgtaaaga tgcttgatca atgttgtcat gattacagtt 3960  
gagctgactg ggcccttggg accggactgg agtgggtggg ggcagtgtcc tgggaccaa 4020  
aagaagcaca aggtctccca atagaggctg cttcctttgt gtccccacca cccgaaagat 4080  
gtcaggtcag agagcccgag agctgcagat ggcttgagta gggctccact cttcagatca 4140  
aaaaactgtg gcccgagag gcgaaggcac ttggccagca tcacagagcc agcacgtggc 4200  
agggccagac cttgagcca ggtcagctgc gtgtattctg ctcagttggt gcagaaaaca 4260  
gttttgtcac tcctatgtca ggtgttaggg actcctttac agatctcagt ggcatcagta 4320  
catccagccc cacctggaga ctgctttctc tctgaaaatt cccagggct tctctctggg 4380  
ctgagagatc tcagcaccgg tatctagaaa atgttccac ccagacctgg ctggatgact 4440  
gctgtttag ctctggaagg ttaggaacta aaaagccac tcctttacct agggtagcta 4500  
agatacactg gagatgggga catggggatg gggccgatta tccaggggcc tgcattgagg 4560  
ggcaaaaggc cctgcagaga gagggtaggg aaggcactgc cagatctgtg aagccatgtg 4620  
cgtgcagcgg ggacattcag acatgagtgc aaggaggac cgtgagcagg gaggtcatgt 4680  
gagaatacac aggcattgct gcacacccat gtgaacttga gtgccaggcc acacactctt 4740  
ttttttttt ttttttttt tagctggagt cttgctccgt cgcccaggct ggagtgcagt 4800  
ggcatgattt cggctcactg tgacctctgc ctcccagggt caagcgattc tcctgcctca 4860  
gccttcctag tagctgggat tacgggtgca agccaccatg ccagctgatt tttttttgt 4920  
attttttagta gagacagggt ttcacatat tggccaggct ggtctcaaac tcctggccct 4980  
gaagtgatac gccacactca gcctccaaa gtgctgggat tacaggcttg agccaccgca 5040  
cccgaccgc acactctttt caataatcat ggatggccag ggggtgcagg tctaaaaagc 5100  
gctgcctagc ccatctgct gttcactggg caagcgacgt cacaggcca ggcttcagt 5160  
tcctcatcca tgctctgct ctgatggcaa tctagccagg atgtggggaa gggaggatgc 5220  
agtgagagca cagatatgag agcatcttg aaataaaaat gtacctgcaa gaggtggtg 5280

tgaattttct tactcaggcc agcttctgcc agggctggca gaaagagggg gtggcatggc 5340  
atggagccgc agggggtgga ggactggctt ccactgctgt gcctgaggaa gccgcggctg 5400  
tttctgggcg ggatgggagt agtgggaggg ggatactggc cttgtgagaa gaaaagggaa 5460  
gtgtctgttt gagaggtttt tgaattagta aaggaggaca ggcgcaaact ccaagcgctt 5520  
cacttgccacc cgggacaaaa cccaatccc agtggctggc tccctgaggc gccccgctcc 5580  
gtcccgcgcg ctgacagcgg ctgggctgga gaaggctcta tacggacaca cctctgggga 5640  
cggggaaccc gactgctccc agctaaagca accgctgttt cctggccccg ctcagacagg 5700  
ctgcaggcct tgtttgagcc ctttcaggg cacctggcct tggattgtct gtggctttgc 5760  
ctngtccgct gtgacttcct ttctacttga gccttgctaa ggcagactct actccctcac 5820  
tcgtaagcag ccangcgtcc agcaggctcct ccaacgtcga tcttggccct aagacgtcca 5880  
gtctgggcac ggagttgttg agatccggca ggaagtccct gctccagggc caaaggcccc 5940  
tcccgggctc ccccggatgt ccccgacccc ccctctattc tccaaaaga aagaagctgc 6000  
ttcccacttt ggaaacgttt attctgagca ccgggaaggg gggcggcggc gggcgctca 6060  
ctggg 6065

<210> 4

<211> 1523

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gggtcgatgg gggagatgga gcaactgcgt caggaagcgg agcagctcaa gaagcagatt 60  
gcagatgcca ggaaagcctg tgctgacgtt actctggcag agctggtgtc tggcctagag 120  
gtggtgggac gagtccagat gcggacgcgg cggacgttaa ggggacacct ggccaagatt 180  
tacgcatgc actgggccac tgattctaag ctgctggtaa gtgcctcgca agatgggaag 240  
ctgatcgtgt gggacagcta caccaccaac aagggtcacg ccatcccact gcgctcctcc 300  
tgggtcatga cctgtgccta tgcccatca gggaaactttg tggcatgtgg ggggctggac 360  
aacatgtgtt ccatctaaa cctcaaatcc cgtgagggca atgtcaaggt cagccgggag 420  
ctttctgctc acacaggtta tctctcctgc tgccgcttcc tggatgacaa caatattgtg 480  
accagctcgg gggacaccac gtgtgccttg tgggacattg agactgggca gcagaagact 540

gtatttgtgg gacacacggg tgactgcatg agcctggctg tgtctcctga cttcaatctc 600  
ttcatttcgg gggcctgtga tgccagtgcc aagctctggg atgtgcgaga ggggacctgc 660  
cgtcagactt tctactggcca cgagtcggac atcaacgcca tctgtttctt cccaatgga 720  
gaggccatct gcacgggctc ggatgacgct tcctgccgct tgtttgacct gcgggcagac 780  
caggagctga tctgcttctc ccacgagagc atcatctgcg gcatcacgtc cgtggccttc 840  
tcctcagtg gccgcctact attcgttggc tacgacgact tcaactgcaa tgtctgggac 900  
tccatgaagt ctgagcgtgt gggcatcctc tctggccacg ataacagggt gagctgcctg 960  
ggagtcacag ctgacgggat ggctgtggcc acaggttcct gggacagctt cctcaaaatc 1020  
tggaactgag gaggctggag aaagggaagt ggaaggcagt gaacacactc agcagcccc 1080  
tgcccgacct catctcattc aggtgttctc ttctatattc cgggtgccat tcccactaag 1140  
ctttctcctt tgagggcagt ggggagcatg ggactgtgcc tttgggaggc agcatcaggg 1200  
acacaggggc aaagaactgc cccatctcct cccatggcct tccttccca cagtcctcac 1260  
agcctctccc ttaatgagca aggacaacct gcccctcccc agccctttgc aggcccagca 1320  
gacttgagtc tgaggcccca ggccctagga ttcttcccc agagccacta cctttgtcca 1380  
ggcctgggtg gtatagggcg tttggccctg tgactatggc tctggcacca ctagggtcct 1440  
ggcctcttc ttattcatgc tttctcctt ttctacctt tttctctcc taagacacct 1500  
gcaataaagt gtagcacct ggt 1523

<210> 5

<211> 1178

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ggggaagcaa aggagaagct gagaagatga aggaaaagtc agggctctgga ggggcggggg 60  
tcaggagct cctgggagat atggccacat gtagcggctc tgaggaatgg gttacaggag 120  
acctctgggg agatgtgacc acagcaatgg gtaggagaat gtccagggt atggaagtgc 180  
agtatcgggg accccccctt aacgaagaca gggccatgta gagggcccca gggagtgaaa 240  
gagcctccag gacctccagg tatggaatac aggggacgtt taagaagata tggccacaca 300  
ctggggccct gagaagtgag agcttcatga aaaaaatcag ggacccaga gttccttgga 360



agccaagact gaaaccagca ttatgagtct ccgggtcaga atgaaagaag aaggcctgcc 420  
ccagtggctt gtgaattccc gggggtgatt tcactccccg ggctgtccca ggcttgtccc 480  
tgctaccccc acccagcctt tcttgaggcc tcaagctgcc accaagcccc cagctccttc 540  
tccccgcaga cccaaacaca ggcctcagga ctcaacacag cttttccctc caaccccggtt 600  
ttctctccct caaggactca gctttctgaa gcccctccca gttctagttc tatctttttc 660  
ctgcatcctg tctggaagtt agaaggaaac agaccacaga cctgggtcccc aaaagaaatg 720  
gaggcaatag gttttgaggg gcatggggac ggggttcagc ctccagggtc ctacacacaa 780  
atcagtcagt ggcccagaag acccccctcg gaatcggagc agggaggatg gggagtgtga 840  
ggggtatcct tgatgcttgt gtgtcccaa ctttccaaat ncccgcccc gcgatggaga 900  
agaaaccgag acagaaggtg caggggccac taccgcttcc tccagatgag cttatgggtt 960  
tctccaccaa ggaagttttc cgctggttga atgattcttt ccccgccctc ctctcgcccc 1020  
agggacatat aaaggcagtt gttggcacac ccagccagca gacgtccct cagcaaggac 1080  
agcagaggac cagctaagag ggagagaagc aactgcagac cccccctgaa aacaaccctc 1140  
agacgccaca tcccctgaca agctgccagg caggttct 1178

<210> 6

<211> 6152

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

tggtatttgg gcggctggtg gcggcgggga ctgttgagg gtgggaggag gcgaaggagg 60  
agggagaacc ccgtgcaacg ttgggacttg gcaaccgcc tccccctgcc caaggatatt 120  
taatttgctt cggaatcgc tgcttcaga ggggaactca ggagggaagg gggcgcgcg 180  
tcctggaggg gcaccgcagg gacccccgac tgtcgctcc ctgtgccgga ctccagccgg 240  
ggcgacgaga gatgcatctt cgctccttcc tgggtggcggc ggcggctgag aggagacttg 300  
gctctcgag gatcggggct gccctcacc cggacgcact gcctccccgc cgggcgtgaa 360  
gcgcccga aa actccggtcg ggctctctcc tgggtcagc agctgcgtcc tccttcagct 420  
gccccctccc gcgcgggggg cggcgtggat ttacagatcg gggtttctgc tgcctccagc 480  
cctgtttgca tgtgccgggc gcgcgcgagg agcctccgcc cccacccgg ttgtttttcg 540

gagcctccct ctgctcagcg ttggtggtgg cgggtggcagc atggcgagcc ctccggagag 600  
cgatggcttc tggacgtgc gcaaggtggg ctacctgcgc aaaccaaga gcatgcacaa 660  
acgtttcttc gtactgcgcg cggccagcga ggctgggggc cggcgcgcc tcgagtacta 720  
cgagaacgag aagaagtggc ggcacaagtc gagcgcccc aaacgctcga tccccittga 780  
gagctgcttc aacatcaaca agcgggctga ctccaagaac aagcacctgg tggctctcta 840  
caccggggac gagcactttg ccatcgcggc ggacagcgag gccgagcaag acagctggta 900  
ccaggctctc ctacagctgc acaaccgtgc taagggccac cacgacggag ctgcggccct 960  
cggggcggga ggtggtggtg ggggcagctg cagcggcagc tccggccttg gtgaggctgg 1020  
ggaggacttg agctacggtg acgtgcccc aggaccgca ttcaaagagg tctggcaagt 1080  
gatcctgaag cccaagggcc tgggtcagac aaagaacctg attggtatct accgcctttg 1140  
cctgaccagc aagaccatca gcttcgtgaa gctgaactcg gaggcagcgg ccgtggtgct 1200  
gcagctgatg aacatcaggc gctgtggcca ctcgaaaac ttcttcttca tcgaggtggg 1260  
ccgtttctgcc gtgacggggc cgggggagtt ctggatgcag gtggatgact ctgtggtggc 1320  
ccagaacatg cacgagacca tcctggaggc catgcgggcc atgagcgatg agttccgccc 1380  
tcgcagcaag agccagtcct cgtccaactg ctctaaccac atcagcgctc ccctgcgccc 1440  
gcaccatctc aacaatcccc cgcccagcca ggtggggctg acccgccgat cacgactga 1500  
gagcatcacc gccacctccc cggccagcat ggtgggcggg aagccaggct ccttccgtgt 1560  
ccgcgcctcc agtgacggcg aaggcaccat gtcccgccca gcctcggtgg acggcagccc 1620  
tgtgagtccc agcaccaaca gaaccacgc ccaccggcat cggggcaggg cccggctgca 1680  
cccccgctc aaccacagcc gctccatccc catgccggt tcccgctgct cccgttcggc 1740  
caccagcccg gtcagtctgt cgtccagtag caccagtggc catggctcca cctcggtttg 1800  
tctcttccca cggcgatcta gtgcttcggt gtctggttcc cccagcgatg gcggtttcat 1860  
ctcctcgat gagtatggct ccagtccctg cgatttccgg agttccttcc gcagtgtcac 1920  
tccgattcc ctgggccaca cccaccagc ccgcggtgag gaggagctaa gcaactatat 1980  
ctgcatgggt ggcaaggggc cctccacct gaccgcccc aacggtcact acattttgtc 2040  
tcggggtggc aatggccacc gctgcacccc aggaacaggc ttgggcacga gtccagcctt 2100  
ggctggggat gaagcagcca gtgctgcaga tctggataat cggttccgaa agagaactca 2160  
ctcggcaggc acatccccta ccattacca ccagaagacc ccgtcccagt cctcagtggc 2220  
ttccattgag gagtacacag agatgatgcc tgcctacca ccaggaggtg gcagtggagg 2280

ccgactgccg ggacacaggc actccgcctt cgtgcccacc cgctcctacc cagaggaggg 2340  
tctggaaatg cacccttgg agcgtcgggg ggggcaccac cgcccagaca gctccaccct 2400  
ccacacggat gatggctaca tgcccatgtc cccaggggtg gccccagtgc ccagtggccg 2460  
aaagggcagt ggagactata tgcccatgag cccaagagc gtatctgccc cacagcagat 2520  
catcaatccc atcagacgcc atccccagag agtggacccc aatggctaca tgatgatgtc 2580  
ccccagcggg ggctgtcttc ctgacattgg aggtggcccc agcagcagca gcagcagcag 2640  
caacgccgtc ccttccggga ccagctatgg aaagctgtgg aaaaacgggg tagggggcca 2700  
ccactctcat gtcttgccct accccaaacc cccagtggag agcagcgggtg gtaagctctt 2760  
accttgaca ggtgactaca tgaacatgtc accagtgggg gactccaaca ccagcagccc 2820  
ctccgactgc tactacggcc ctgaggaccc ccagcacaag ccagtcctct cctactactc 2880  
attgccaaga tcctttaagc acaccagcg ccccggggag ccggaggagg gtgcccggca 2940  
tcagcacctc gcctttcca ctagctctgg tcgccttctc tatgtgcaa cagcagatga 3000  
ttcttctct tccaccagca gcgacagcct ggggtggggga tactgcgggg ctaggctgga 3060  
gcccagcctt ccacatcccc accatcaggt tctgcagccc catctgcctc gaaaggtgga 3120  
cacagctgct cagaccaata gccgcctggc ccggccacg aggctgtccc tgggggatcc 3180  
caaggccagc accttacctc gggcccgaga gcagcagcag cagcagcagc ccttgctgca 3240  
ccctccagag cccaagagcc cgggggaata tgtcaatatt gaatttggga gtgatcagtc 3300  
tggtacttg tctggcccgg tggctttcca cagctcacct tctgtcaggt gtccatcca 3360  
gctccagcca gctcccagag aggaagagac tggcactgag gagtacatga agatggacct 3420  
ggggccgggc cggagggcag cctggcagga gagcactggg gtcgagatgg gcagactggg 3480  
ccctgcacct cccggggctg ctagcatttg caggcctacc cgggcagtgc ccagcagccg 3540  
gggtgactac atgaccatgc agatgagttg tccccgtcag agctacgtgg acacctgcc 3600  
agctgccct gtaagctatg ctgacatgcg aacaggcatt gctgcagagg aggtgacct 3660  
gcccagggcc accatggctg ctgcctctc atcctcagca gcctctgctt ccccgactgg 3720  
gcctcaagg gcagcagagc tggctgcca ctcgtccctg ctggggggcc cacaaggacc 3780  
tgggggcatg agcgccttca cccgggtgaa cctcagtcct aaccgcaacc agagtgccaa 3840  
agtgatccgt gcagaccac aagggtgccg gcggaggcat agctccgaga ctttctctc 3900  
aacaccagt gccaccggg tgggcaacac agtgccctt ggagcggggg cagcagtagg 3960  
gggcggtggc ggtagcagca gcagcagcga ggatgtgaaa cgccacagct ctgcttcctt 4020

tgagaatgtg tggctgaggc ctggggagct tgggggagcc cccaaggagc cagccaaact 4080  
gtgtggggct gctgggggtt tggagaatgg tcttaactac atagacctgg atttgggtcaa 4140  
ggacttcaaa cagtgccttc aggagtgcac ccctgaaccg cagcctcccc cacccccacc 4200  
ccctcatcaa cccctgggca gcggtgagag cagctccacc cgccgctcaa gtgaggattt 4260  
aagcgcctat gccagcatca gtttccagaa gcagccagag gaccgtcagt agctcaactg 4320  
gacatcacag caggtcgttt catggtgaca aagtcagaag acaaaactgc ttttaacctt 4380  
gtccttgaat tctgttcttc gcctctgccc cttcctgttc tttccactg cttcctcagg 4440  
gagaatgcac ttacattctc agggcataca agatgctcac ccacactgac attggcagag 4500  
agtcaaacia acatgtagga gcagccacag gagggccttt tcgtttgagg aattcccaag 4560  
tgaagtagtt actgcagtat ttttaacat atatcctatg ccagttctgc gttttgtaga 4620  
gttcctccgt aagaagcttg atttgtttgt tgaagtttc ttttactat atatttaggt 4680  
cagcccctgg aaggacagtt ctacaaaaaa taccgtaa cacaggggct aaacccttcc 4740  
ttatcttaaa ctatcttaat agtttctggg agcccttaag ggtgatctta tcaagttgtt 4800  
ctctgtactt ttgttctgtg atttcataat actagggcaa cataaacagc agcgggaagc 4860  
attgatttct attcatcctg ccctaaaaag atcaggagta agagcttttt agaaatatgt 4920  
atttagagag aagtacctat ctattttgtg atctctcaag aaagtaatta tgggtgacgt 4980  
tctccttttg ttcattgtacc aggatttgtg aaatattatt cacacaaccg acccaccatc 5040  
ccacgggcct ggctctctt gtacaggata tgcaggaaac tctgtatgtg tctgggaccc 5100  
attattaaga gttatgggag ttcattcctag gatgtctgcc ttatagttat ctcttcttct 5160  
tgcactgaga cattacagat atcatttggg ggctactata tatcttctgt aaaattactt 5220  
ttatttgttg aagaagaatg catactaagt caggaacatg ccttaatttg ttttgttttg 5280  
caattgagta gaagggctaa actgtatccc tccactttta gggttatttg cctgtgtgcc 5340  
tttaagttca aaagtagaca ccacagtaaa tgctgaaagt tggctttagg tcttctgtgg 5400  
ctaagccgt attaaaaatg aaaaacattt gtggtagaaa ttagcctgcc ctctgttctg 5460  
ttgatcctgt tttctgggtg tcataattgt gggtagaaga gagtacagtt tgcaaataat 5520  
gtgatgagtt ggcaatgcag aagtttccag catttggaaa cactttactc tgacaaactg 5580  
attatcttgt gaattttatc tatgctccac agaagtagct tttaaaagca ctgatttttc 5640  
ttaatttgtg tccattcata agaaattaat ctgtgccctg gtttcctatt gacaggtatt 5700  
tatttatcat gtgttcatag tcttcttaat tctgtttcca atatttgatc catataattc 5760

tctatatttat aaagcaagaa aaaggtatat gaacactcaa atgaagattt tgggtgatat 5820  
gttacaaaaa gcatttatatt gatcagtatt tacttcaaca tttatatttca tcattcacta 5880  
gaagaaagat ttaatttgtgt atatcaacat cagtagtaca aatcttgtta tatcaaatga 5940  
tgtttttggg agttcagaat ccctcaacac ttttaagcatt tgtattataa agtgcctcat 6000  
tggtaaaata atgagaattt gaagaaaacc agcccagcag aactaaaatt ttggtttttaa 6060  
aggagataaa gagaataagt ttttcttact tgtcatctta atttgtttag gtttcttttt 6120  
atagagtaga ataaatgatg tttgctctga ag 6152

<210> 7

<211> 2480

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gacgctctgt gccttcggag gtctttctgc ctgcctgtcc tcatgcctct cctcctcttg 60  
ctgctcctgc tgccaagccc ctacacccc caccatct gtgaggctc caaagtggcc 120  
agccacctag aagtgaactg tgacaagagg aatctgacag cgctgcctcc agacctgccg 180  
aaagacacaa ccacctcca cctgagttag aacctctgt acaccttct cctggcaacc 240  
ctgatgcctt acactgcct cactcagctg aacctagata ggtgagct caccaagctc 300  
caggctgatg ggacgctgcc agtgctgggg accctggatc tatccacaa tcagctgcaa 360  
agcctgccct tgctagggca gacactgcct gctctaccg tcttgagct ctccttcaac 420  
cggctgacct cgctgcctct tgggtgccctg cgtggtcttg gcgaactcca agagctctac 480  
ctgaaaggca atgagctgaa gacctgccc ccagggtcc tgacgcccac acccaagctg 540  
gagaagctca gtctggctaa caacaacttg actgagctcc ccgctgggct cctgaatggg 600  
ctggagaatc tcgacacct tctcctcaa gagaactgc tgtatacaat accaaagggc 660  
ttttttgggt cccacctct gccttttgct tttctccacg ggaaccctg gttatgcaac 720  
tgtgagatcc tctatattcg tcgtggctg caggacaatg ctgaaaatgt ctacgtatgg 780  
aagcaagggtg tggacgtcaa ggccatgacc tctaactgg ccagtgtgca gtgtgacaat 840  
tcagacaagt ttccgtcta caaatacca ggaaaggggt gccccacct tggatgtaa 900  
ggtgacacag acctatatga ttactacca gaagaggaca ctgaggcgga taaggctcgt 960

gccacaagga ctgtgggtcaa gttccccacc aaagcccata caaccccctg ggggtctattc 1020  
tactcatggt ccaactgcttc tctagacagc caaatgccct cctccttgca tccaacacaa 1080  
gaatccacta aggagcagac cacattccca cctagatgga ccccaaattt cacacttcac 1140  
atggaatcca tcacattctc caaaactcca aaatccacta ctgaaccaac cccaagcccg 1200  
accacctcag agcccgctcc ggagcccgcc ccaaactga ccaccctgga gccactcca 1260  
agcccgacca cccagagcc caccicagag cccgccccca gcccgaccac cccggagccc 1320  
acccaatcc cgaccatcgc cacaagcccg accatcctgg tgtctgccac aagcctgatc 1380  
actccaaaaa gcacattttt aactaccaca aaaccgctat cactcttaga atccacaaa 1440  
aaaaccatcc ctgaacttga tcagccacca aagctccgtg ggggtgctcca agggcatttg 1500  
gagagctcca gaaatgacc ttttctccac cccgactttt gctgcctcct cccctgggc 1560  
ttctatgtct tgggtctctt ctggctgctc ttgcctctg tggctcctcat cctgctgctg 1620  
agctgggttg ggcattgtga accacaggcc ctggactctg gccaaaggtg tgctctgacc 1680  
acagccacac aaaccacaca cctggagctg cagaggggac ggcaagtga agtgccccgg 1740  
gcctggctgc tcttccttcg aggttcgctt cccactttcc gctccagcct cttcctgtgg 1800  
gtacggccta atggccgtgt ggggcctcta gtggcaggaa ggaggccctc agctctgagt 1860  
cagggtcgtg gtcaggacct gctgagcaca gtgagcatta ggtactctgg ccacagcctc 1920  
tgagggtggg aggtttgggg accttgagag aagagcctgt gggctctcct attggaatct 1980  
agttgggggt tggaggggta aggaacacag ggtgataggg gaggggtctt agttcctttt 2040  
tctgtatcag aagccctgtc ttcacaacac aggcacacaa tttcagtccc agccaaagca 2100  
gaaggggtaa tgacatggac ttggcggggg gacaagacaa agtcccgat gctgcatggg 2160  
gcgctgccag atctacggt gaaccatttt ggcagaatac agcatggttc ccacatgcat 2220  
ttatgcacag aagaaaatct ggaaagtgat ttatcaggat gtgagcactc gttgtgtctg 2280  
gatgttacia atatgggtgg ttttattttc ttttccctg tttagcattt tctagttttc 2340  
ttatcaggat gtgagcactc gttgtgtctg gatgttacia atatgggtgg ttttattttc 2400  
ttttccctg tttagcattt tctagttttc cactattatt gtatattatc tgtataataa 2460  
aaaataattt tagggttggg 2480

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 8

gagtctacct gtttactatc aanaa

25

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 9

gagtctacct gtttactatc aanga

25

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 10

accagtacta aagcaaatta aact

24

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 11

gcagtttatt aagatgaggn cg

22

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 12

ttgcagttta ttaagatgag gntg

24

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 13

ggtgctccct gtcataaatt tga

23

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer



<400> 14

ccttctcagc ttcattgcagg

20

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 15

gtcttggtgg cgtgcttca

19

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 16

tctgcggcat cacgtncg

18

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 17

tctgcggcat cacgtntg

18

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 18

gaatagtagg cggccactga

20

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 19

tctacatggc cctgtcttng t

21

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 20

ctctacatgg ccctgtcttn at

22

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 21

ctctacatgg ccctgtcttt at

22

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 22

ccccatcctc cctgctnccg

19

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 23

ccccatcctc cctgctntg

19

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 24

agtcagtggc ccagaagacc

20

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 25

gggccctgca cctcnngg

18

<210> 26

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 26

gggccctgca cctcnag

18

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 27

gggtaggcct gcaaatagcta

20

<210> 28

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 28

cccagggtc ctgncg

16

<210> 29

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 29

ccccagggt cctgntg

17

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 30

tgagcttctc cagcttgggt g

21

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Probe

&lt;400&gt; 31

cagcttcatg cagggtaca

20

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Probe

&lt;400&gt; 32

cagcttcatg cagggttaca

20

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Probe

&lt;400&gt; 33

acatggccct gtcttngtta ag

22

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Probe

<400> 34

acatggccct gtcttnatta ag

22

<210> 35

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Probe

<400> 35

cacctcngg ggctgctag

19

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Probe

<400> 36

cacctccnag ggctgctag

19

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は実施例におけるスクリーニング関連解析において検討した112遺伝子多

型をまとめた表である。

【図 2】

図 2 は同じく実施例におけるスクリーニング関連解析において検討した112遺伝子多型をまとめた表である。

【図 3】

図 3 は実施例において遺伝子型を決定するために使用されるプライマー（上から順に配列番号 16、17、18、14、15、11、12、13、8、9、10、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30）及びプローブ（上から順に配列番号 31、32、33、34）及びその他の条件をまとめた表である。図中、FITCはフルオレセインイソチオシアネートを、TxRはテキサスレッドを、Biotinはビオチンをそれぞれ表す。

【図 4】

図 4 は実施例の関連解析において検討した一塩基多型をまとめた表である。

【図 5】

図 5 は実施例における関連解析の対象とした男性1107例及び女性833例の背景データをまとめた表である。年齢、Body mass index、収縮期血圧、拡張期血圧、血清クレアチニンの各データは平均±標準偏差で表される。表中、\*1は $P<0.001$ を、\*2は $P<0.001$ を、\*3は $P<0.01$ をそれぞれ表す。

【図 6】

図 6 は関連解析の対象とした遺伝子多型と多項ロジスティック回帰分析の結果をまとめた表である。各SNPにおいて低い方のP値は太字で表される。

【図 7】

図 7 は高血圧と関連のある遺伝子多型について遺伝子型の分布を示した図である。

【図 8】

図 8 は高血圧と関連のある遺伝子多型における多項ロジスティック回帰分析の step forward selection methodを行った結果を示す表である。

【図 9】

図 9 は男性における4個の組合せ遺伝子多型を用いた高血圧の遺伝的リスク診



断を行った結果を示す表である。

【図 10】

図 10 は女性における4個の組合せ遺伝子多型を用いた高血圧の遺伝的リスク診断を行った結果を示す表である。

【図 11】

図 11 は高血圧のリスク診断における累積オッズ比と一塩基多型の数の関連を表したグラフである。(A) は男性、(B) は女性における関連を示す。(A) における各 SNP は、SNP1:GPIa(1648A→G)多型、SNP2:CCR2(190G→A)多型、SNP3:ApoC-II I(1100C→T)多型、SNP4:GP  $\beta$  3(825C→T)多型である。(B) における各 SNP は、SNP1:TNF  $\alpha$  (-850C→T)多型、SNP2:TNF  $\alpha$  (-238G→A)多型、SNP3:IRS-1(3494G→A)多型、SNP4:GPIb  $\alpha$  (1018C→T)多型である。

## 【書類名】

## 図面

## 【図 1】

遺伝子	多型	遺伝子	多型
アンギオテンシン変換酵素	I/D in intron 16	インスリン受容体サブストレート 1	3494G→A (Gly972Arg)
アンギオテンシン II タイプ I 受容体	-535C→T	インターロイキン 10	-1082G→A
アンギオテンシンノーゲン	-6G→A		-819T→C
アポリポプロテイン A1	-75G→A		-592A→C
	83C→T	インターロイキン 1α	-889C→T
アポリポプロテイン B	I/D in signal peptide	インターロイキン 1β	-511C→T
アポリポプロテイン C-III	-482C→T		3953C→T
	1100C→T	インターロイキン 6	-634C→G
アポリポプロテイン E	-491A→T		-174G→C
	-219G→T	LDL 受容体関連タンパク質	766C→T
	3932T→C (Cys112Arg)	レプチン	-1887C→A
アポリポプロテイン(a)	4070C→T (Arg158Cys)	リポプロテインリパーゼ	280G→A (Asp9Asn)
	93C→T		1127A→G (Asn291Ser)
	121G→A	マンガンスーパーオキシドジスムターゼ	47C→T (Ala16Val)
ATP-結合カセットトランスポーター-1	11764A→C (Thr12Pro)		173T→C (Ile58Thr)
	-477C→T	マトリックス Gla タンパク質	-7G→A
心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)	1051G→A (Arg219Lys)		7158A→G (Thr83Ala)
ANP クリアランス受容体	664G→A (Val7Met)	メタロプロテナーゼ 1(コラゲナーゼ)	-1607G→GG
	-55A→C	メタロプロテナーゼ 12	-82A→G
		(マクロファージ エラスターゼ)	
β2-アドレナリンレ受容体	46A→G (Arg16Gly)	メチオニンシンターゼ	2756A→G (Asp919Gly)
	79C→G (Gln27Glu)	メチレンテトラヒドロ葉酸リダクターゼ	677C→T (Ala222Val)
	491C→T (Thr164Ile)	単球ケモカイン誘引タンパク (MCP) 1	-2518G→A
β3-アドレナリン受容体	190T→C (Trp64Arg)	NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス	242C→T (His72Tyr)
β-フィブリノーゲン	-854G→A	ニューロペプチド Y	1128T→C (Leu7Pro)
	-455G→A	パラオキシナーゼ	-107T→C
	148C→T		172A→T (Met55Leu)
CD14 受容体	8059G→A (Arg448Lys)		584G→A (Gln192Arg)
	-260C→T	PECAM1 (CD31)	1454C→G (Leu125Val)

【図 2】

ケモカイン受容体 2	190G→A (Val64Ile)	PECAM1 (CD31)	442G→A (Ser563Asn)
コレステロールエステル輸送タンパク	1061A→G (Ile405Val)	ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 $\alpha$	696C→G (Leu162Val)
	1163A→G (Asp442Gly)	ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 $\gamma$ 2	34C→G (Pro12Ala)
	1200G→A (Arg451Gln)		344C→A (Pro115Gln)
凝固因子 V	1691G→A (Arg506Gln)	プラスミノゲン活性化因子インヒビター-1-668/4G→5G	
凝固因子 VII	11496G→A (Arg353Glu)	血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ	994G→T (Val279Phe)
凝固因子 XII	46C→T	プロトロンビン	20210G→A
凝固因子 XIII A-サブユニット	163G→T (Val34Leu)	P-セレクチン	76666A→C (Thr715Pro)
コネシン 37	1019C→T (Pro319Ser)	スカベンジャー受容体 BI	4G→A (Gly2Ser)
内皮型一酸化窒素合成酵素	-786T→C		403G→A (Val135Ile)
	894G→T (Glu298Asp)	セロトニン 2A 受容体 r	102T→C
エンドセリン 1	5665G→T (Lys198Asn)	ストロメライシン-1	-1171/5A→6A
E-セレクチン	98G→T	トロンボモジュリン	-33G→A
	561A→C (Ser128Arg)		-10GG→TA
細胞外スーパーオキシジスラムターゼ	1839C→T (Leu554Phe)		845G→A (Ala25Thr)
脂肪酸結合タンパク 2	5775C→G (Arg213Gly)	トロンボポイエチン	2136C→T (Ala455Val)
フラクタルカイン受容体	2445G→A (Ala54Thr)	トロンボスポンジン 1	5713A→G
グリコプロテイン Ia	84635G→A (Val249Ile)	トロンボスポンジン 4	2210A→G (Asn700Ser)
	807C→T	外因系凝固 (組織因子) インヒビター	1186G→C (Ala387Pro)
	873G→A	トランスフォーミング増殖因子 $\beta$ 1	874G→A (Val264Met)
	1648A→G (Lys505Glu)		-509C→T
グリコプロテイン Ib $\alpha$	1018C→T (Thr145Met)	腫瘍壊死因子 $\alpha$	869T→C (Leu10Pro)
グリコプロテイン IIIa	1565T→C (Leu33Pro)		-863C→A
グリコプロテイン PC-1	97A→C (Lys121Gln)		-850C→T
G-タンパク質 $\beta$ 3 サブユニット	825C→T (splice variant)		-308G→A
ヘモクロマトーシス関連タンパク質	845G→A (Cys282Tyr)		-238G→A
肝性リパーゼ	-480C→T	フォンビルブランド因子	-1234C→T
	-250G→A		-1051G→A

【図 3】

遺伝子	一塩基多型	標識	プライマー	回数	プローブ	ホルミアミド
G-タンパク質β3サブユニット	825C→T	TxR FITC Biotin	TCTGGGCATCACGTXCG TCTGGGCATCACGTXIG GAATAGTAGGGGCCACTGA	35		
アポリポプロテイン C-III	1100C→T	Biotin	CCCTCTCAGCTTCATGCAGG		CAGCTTCATGCAGGGCTACA	
ケモカイン受容体 2	190G→A	Biotin FITC	GCTTGGTGGCGTGCTCA GCAGTTTATTAAAGATGAGGXCG	35	CAGCTTCATGCAGGGCTACA	35%
グリコプロテイン Ia	1648A→G	TxR Biotin FITC	TTCAGGTTTATTAAAGATGAGGXIG GGTGCTCCCTGTCATAAATTGA GAGTCTACCTGTTTACTATCAAXAA	40		
腫瘍壊死因子α	-850C→T	TxR Biotin	GAGTCTACCTGTTTACTATCAAXGA ACCAGTACTAAAGCAAATTAAACT TCTACATGGCCCTGCTTXGT	40	ACATGGCCCTGCTTXGTTAAG ACATGGCCCTGCTTXATTAAAG	30%
腫瘍壊死因子α	-238G→A	Biotin FITC TxR Biotin	CTCTACATGGCCCTGCTTXAT CTCTACATGGCCCTGCTTTAT CCCCATCCTCCCTGCTXCG CCCCATCCTCCCTGCTXIG AGTCAGTGGCCAGAAAGACC	35 40		
インスリン受容体サブストレート 1	3494G→A	Biotin FITC TxR Biotin	GGGCCCTGCACCTCCXAG GGGCCCTGCACCTCCXGG GGGCCCTGCACCTCCXAG GGGTAGGCCCTGCAAAATGCTA	40	CACCTCCXAGGGGCTGCTAG CACCTCCXAGGGGCTGCTAG	35%
グリコプロテイン Ibα	1018C→T	Biotin FITC TxR Biotin	CCCAGGGCTCCTGXCG CCCAGGGCTCCTGXIG TGAGCTTCTCCAGCTTGGGTG	40		

【図 4】

遺伝子	多型	遺伝子	多型
男性			
アンギオテンシノーゲン	-6G→A	女性	
アポリipoprotein C-III	-482C→T	アポリipoprotein C-III	-482C→T
アポリipoprotein C-III	1100C→T	アポリipoprotein E	3932T→C
アポリipoprotein E	-219G→T	アポリipoprotein E	4070C→T
アポリipoprotein E	4070C→T	ATP-結合カセットトランスポーター1	1051G→A
ケモカイン受容体2	190G→A	CD14受容体	-260C→T
コネキシン37	1019C→T	コネキシン37	1019C→T
内皮型一酸化窒素合成酵素	-786T→C	E-セレクチン	561A→C
G-タンパク質β3サブユニット	825C→T	内皮型一酸化窒素合成酵素	-786T→C
グリコipoprotein Ia	1648A→G	エンドセリン1	5665G→T
インターロイキン10	-819T→C	脂肪酸結合タンパク2	2445G→A
インターロイキン10	-592A→C	グリコipoprotein Iba	1018C→T
NADH/NADPHオキシダーゼp22フォックス	242C→T	インスリン受容体サブストレート1	3494G→A
血小板活性化因子αセチルヒドロラーゼ	994G→T	インターロイキン6	-634C→G
トロノモジュリン	2136C→T	パラオキシナーゼ	584G→A
トロノボイイチン	5713A→G	プラスミノーゲン活性化因子ヒヒター1	-668/4G→5G
トロノボスポンジン4	1186G→C	ストロメライシン-1	-1171/5A→6A
トランスフォーミング増殖因子β1	869T→C	腫瘍壊死因子α	-850C→T
腫瘍壊死因子α	-863C→A	腫瘍壊死因子α	-238G→A

【図 5】

	男性 (n = 1107)		女性 (n = 833)	
	対照 (n = 533)	高血圧例 (n = 574)	対照 (n = 340)	高血圧例 (n = 493)
年齢 (years)	56.3 ± 11.0	59.6 ± 10.1*1	56.8 ± 11.4	62.6 ± 10.5*1
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	23.2 ± 2.7	23.9 ± 2.7*2	22.2 ± 2.9	23.6 ± 3.4*1
喫煙 (%)	58.5	47.6†	10.6	8.5
収縮期血圧 (mmHg)	121 ± 13	161 ± 27*1	118 ± 15	164 ± 26*1
拡張期血圧 (mmHg)	72 ± 10	92 ± 16*1	68 ± 10	90 ± 16*1
糖尿病 (%)	15.6	19.5	12.1	16.6
高コレステロール血症 (%)	29.8	34.7	41.8	54.6*2
高尿酸血症 (%)	13.9	21.1*3	6.5	13.0*3
血清クレアチニン (mg/dL)	0.92 ± 0.22	1.02 ± 0.45*1	0.71 ± 0.19	0.73 ± 0.34

【図6】

遺伝子	多型	Dominant		Recessive		Additive	
		P	オッズ比 (95%信頼区間)	P	オッズ比(95%信頼区間)	P	オッズ比(95%信頼区間)
男性							
ケモカイン受容体2 G-タンパク質β3サブユニット グリコプロテインIa アポリポプロテインC-III	190G→A	0.0471	1.3 (1.0-1.6)	0.0151	1.8 (1.1-2.8)	0.0077	1.9 (1.2-3.0)
	825C→T	0.0235	1.4 (1.0-1.8)	0.0342	1.4 (1.0-1.8)	0.0075	1.6 (1.1-2.3)
	1648A→G	0.7058		0.0266	0.6 (0.4-0.9)	0.7037	
	1100C→T	0.5137		0.0373	0.8 (0.6-1.0)	0.1592	
女性							
腫瘍壊死因子α 腫瘍壊死因子α インスリン受容体サブストレートI グリコプロテインIbα	-238G→A	0.0054	0.3 (0.1-0.7)	0.6903		0.0349	0.3 (0.2-0.9)
	-850C→T	0.3200		0.0354	5.0 (1.4-32.2)	0.0336	5.1 (1.4-32.9)
	3494G→A	0.0462	2.5 (1.1-6.6)	0.8127		0.0631	
	1018C→T	0.0484	0.7 (0.5-1.0)	0.3777		0.0215	0.6 (0.4-0.9)

【図 7】

遺伝子		多型		遺伝子型分布 (%)			
				対照		高血圧例	
男性							
ケモカイン受容体2	190G→A	GG (54.6)	GA (38.9)	AA (6.5)	GG (49.7)	GA (40.1)	AA (10.1)
G-タンパク質β3サブユニット	825C→T	CC (29.9)	CT (48.9)	TT (21.1)	CC (24.0)	CT (50.7)	TT (25.3)
グリコプロテインIa	1648A→G	AA (0.0)	AG (6.6)	GG (93.4)	AA (0.4)	AG (9.3)	GG (90.3)
アポリポプロテインC-III	1100C→T	CC (15.1)	CT (44.6)	TT (40.3)	CC (16.7)	CT (49.3)	TT (34.1)
女性							
腫瘍壊死因子α	-238G→A	GG (94.6)	GA (4.5)	AA (0.9)	GG (97.3)	GA (2.7)	AA (0.0)
腫瘍壊死因子α	-850C→T	CC (75.3)	CT (24.1)	TT (0.6)	CC (71.9)	CT (24.5)	TT (3.6)
インスリン受容体サブストレート1	3494G→A	GG (97.9)	GA (2.1)	AA (0.0)	GG (95.2)	GA (4.4)	AA (0.4)
グリコプロテインIbα	1018C→T	CC (74.5)	CT (23.7)	TT (1.8)	CC (79.7)	CT (18.4)	TT (1.9)



【図 8】

遺伝子	遺伝子座	多型	遺伝モデル	オッズ比	95% 信頼区間
男性					
グリコプロテインIa	5q23-q31	1648A→G	GG versus AA + AG	0.56	0.35-0.91
ケモカイン受容体2	3p21	190G→A	AA versus GG + GA	1.65	1.04-2.60
アポリポプロテインC-III	11q23	1100C→T	TT versus CC + CT	0.73	0.57-0.95
G-タンパク質β3サブユニット	12p13	825C→T	CT + TT versus CC	1.32	0.99-1.74
女性					
腫瘍壊死因子α	6p21.3	-850C→T	TT versus CC + CT	4.63	1.02-20.93
腫瘍壊死因子α	6p21.3	-238G→A	GA + AA versus GG	0.28	0.12-0.66
インスリン受容体サブストレート1	2q36	3494G→A	GA + AA versus GG	2.10	0.83-5.30
グリコプロテインIba	22q11.2	1018C→T	CT + TT versus CC	0.74	0.51-1.09

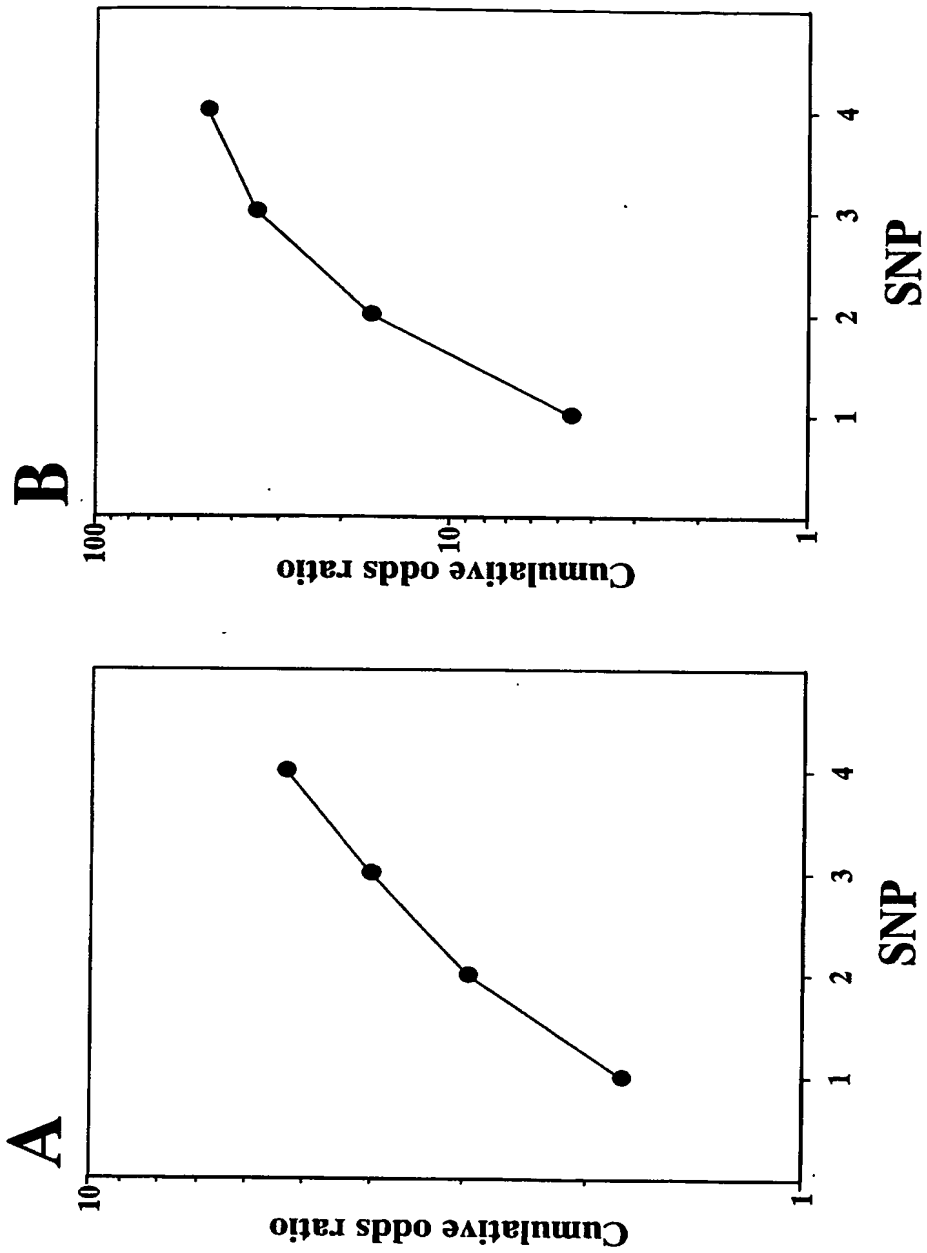
【図 9】

グリコプロテイン Ia (0 = AA = AG, 1 = GG)	ケモカイン受容体 2 (0 = GG = GA, 1 = AA)	アポリポプロテイン C-III (0 = CC = CT, 1 = TT)	G-タンパク質 $\beta 3$ サブユニット (0 = CC, 1 = CT = TT)	オッズ 比
0	1	0	1	5.34
0	1	0	0	4.05
0	1	1	1	3.90
0	1	1	0	2.95
0	0	0	1	3.24
0	0	0	0	2.45
0	0	1	1	2.36
0	0	1	0	1.79
1	1	0	1	2.98
1	1	0	0	2.26
1	1	1	1	2.18
1	1	1	0	1.65
1	0	0	1	1.81
1	0	0	0	1.37
1	0	1	1	1.32
1	0	1	0	1.00

【図10】

腫瘍壊死因子 $\alpha$ (0 = CC, 1 = TT)	Tu腫瘍壊死因子 $\alpha$ (0 = GG, 1 = GA = AA)	インスリン受容体サブストレート1 (0 = GG, 1 = GA = AA)	グリコプロテインIb $\alpha$ (0 = CC, 1 = CT = TT)	オッズ 比
1	0	1	0	46.86
1	0	1	1	34.71
1	0	0	0	22.31
1	0	0	1	16.53
1	1	1	0	13.13
1	1	1	1	9.72
1	1	0	0	6.25
1	1	0	1	4.63
0	0	1	0	10.12
0	0	1	1	7.50
0	0	0	0	4.82
0	0	0	1	3.57
0	1	1	0	2.84
0	1	1	1	2.10
0	1	0	0	1.35
0	1	0	1	1.00

【図 11】



## 【書類名】

要約書

## 【要約】

【課題】 高精度で予知確率の高い高血圧の遺伝的リスクを診断する手段を提供する。

【解決手段】 以下の工程を含んでなる方法により高血圧のリスク診断を行う。

(i) 高血圧との関連が認められた4個の遺伝子多型より選択される二つ以上の多型を解析する工程、

(ii) 前記工程によって得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定する工程、及び

(iii) 決定された遺伝子型から高血圧の遺伝的リスクを求める工程。

【選択図】 図 1 1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-280034
受付番号	50201435885
書類名	特許願
担当官	宇留間 久雄 7277
作成日	平成14年 9月27日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 9月25日
-------	-------------

次頁無

特願2002-280034

出願人履歴情報

識別番号

[598091860]

1. 変更年月日  
[変更理由]

1998年 7月 9日

新規登録

住 所  
氏 名

愛知県名古屋市中区栄二丁目10番19号  
財団法人名古屋産業科学研究所

特願 2002-280034

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[500572649]

1. 変更年月日 2000年12月14日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 岐阜県可児郡御嵩町御嵩字南山2193番地の128  
氏 名 財団法人岐阜県国際バイオ研究所
2. 変更年月日 2003年 5月 9日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 岐阜県各務原市那加不動丘1丁目1番地  
氏 名 財団法人岐阜県国際バイオ研究所